

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS-JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

Ülvi Kana

**NHEJ ensüümide osalus mutatsiooni protsessides bakteris *Pseudomonas putida***

Magistritöö

Juhendaja Ph. D. Maia Kivisaar

TARTU 2013

# Sisukord

Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 DNA kahjustuste tekkimine bakterirakkudes.....	6
1.2 DNA kahjustuste reparatsioon.....	6
1.2.1 Nukleotiidide väljalõikamise reparatsioon NER.....	6
1.2.2 Aluse väljalõikamise reparatsioon BER .....	7
1.2.3 GO reparatsioonirada .....	8
1.2.4 DNA valepaardumiste reparatsioon MMR.....	8
1.2.5 Homoloogiline rekombinatsioon HR.....	9
1.2.6 Mittehomoloogiline DNA otste ühendamine bakterites.....	10
1.2.6.1 Ku valk.....	13
1.2.6.2 DNA ligaasid bakterirakkudes.....	13
1.2.6.3 LigD valk.....	14
1.3 Statsionaarse faasi mutagenees bakterites.....	18
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	20
2.1 Töö eesmärgid.....	20
2.2 Materjal ja metoodika.....	20
2.2.1 Söötmed, bakteritüved, plasmiidid.....	20
2.2.2 ligD ja ku geenide suhtes defektsete <i>P. putida</i> tüvede konstrueerimine.....	22
2.2.3 LigD üleekspressiooniga <i>P. putida</i> tüve konstrueerimine.....	25
2.2.4 PCR.....	25
2.2.5 Plasmiidse DNA eraldus ja restriktioonianalüüs.....	29
2.2.6 Geelelektroforees ja PCR produktide puhastamine geelist.....	29
2.2.7 Bakterite elektroporatsioon.....	30
2.2.8 Bakterite konjugatsioon.....	30
2.2.9 DNA sekveneerimine „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ reaktiividega .....	31
2.2.10 ARB-PCR ja DNA sekveneerimine.....	32
2.2.11 Mutatsioonide tekkesageduse määramine nälgivates <i>P. putida</i> rakkudes...33	33
2.2.12 Mutatsioonisageduste võrdlus ANOVA statistilise analüüsi meetodi ja „Tukey“ testi abil.....	34
2.2.13 Mutatsioonispektri analüüs kasutades Monte Carlo meetodit ja hii-ruut testi 35	35
2.2.14 Ekspponentsiaalselt kasvavates <i>P. putida</i> kultuurides rifampitsiin-resistentsete mutantide tekkesageduse määramine.....	35
2.2.15 Statsionaarses faasis <i>P. putida</i> kultuurides rifampitsiin-resistentsete mutantide tekkesageduse määramine.....	36
2.2.16 <i>P. putida</i> tüvede kemikaalide tundlikkuse testimine.....	36
2.3 Tulemused.....	37
2.3.1 LigD ja Ku osalus <i>P. putida</i> statsionaarse faasi mutageneesil.....	38
2.3.2 Sigma faktori RpoS mõju statsionaarse faasi mutageneesile NHEJ valkude defektsetes tüvedes.....	41
2.3.3 <i>lacI-P<sub>tac</sub></i> ligD geenikasseti asukoha määramine erinevatel tüvedel.....	43
2.3.4 LigD üleekspressiooni mõju statsionaarse faasi mutageneesile.....	43
2.3.5 Phe <sup>+</sup> mutantide DNA järjestuse analüüs.....	46
2.3.6 NHEJ valkude puudumise ja LigD üleekspressiooni mõju mutatsioonide tekkesagedusele kasvavates <i>P. putida</i> rakkudes.....	49
2.3.7 NHEJ ja HR defektsete tüvede kemikaalide tundlikkuse määramine.....	51

2.4 Arutelu.....	53
Kokkuvõte.....	58
Summary.....	59
Kasutatud kirjandus.....	60
Kasutatud veebiaadressid.....	68

## Kasutatud lühendid

Amp	<i>ampicillin</i>	ampitsilliin
AP-sait	<i>apurinic/apyrimidinic site</i>	apuriin/apürimidiin sait
BER	<i>base excision repair</i>	aluse väljalõike reparatsioon
CAA	<i>Casamino acids</i>	aminohapete lahus
Cb	<i>carbenicillin</i>	karbenitsilliin
CFU	<i>colony forming units</i>	kolooniat moodustav ühik
CIP	<i>ciprofloxacin</i>	ciprofloksatsiin
DSBs	<i>double strand breaks</i>	DNA kaksikahelalised katked
dsDNA	<i>double strand DNA</i>	kaheahelaline DNA
EP DNAP	<i>error-prone DNA polymerase</i>	vigu tegev DNA polümeraas
GASP	<i>growth advantage in stationary phase</i>	statsionaare faasi kasvueel
Glc	<i>glucose</i>	glükoos
GO	<i>7,8-dihydro-8-oxoguanine</i>	oksüdeeritud guaniin
HR	<i>homologous recombination</i>	homoloogiline rekombinatsioon
Km	<i>kanamycin</i>	kanamütsiin
LigA	<i>NAD<sup>+</sup>-dependent ligase A</i>	NAD <sup>+</sup> -sõltuv DNA ligaas A
LigB	<i>ATP-dependent ligase B</i>	ATP-sõltuv DNA ligaas B
LigC	<i>ATP-dependent ligase C</i>	ATP-sõltuv DNA ligaas C
LigD	<i>ATP-dependent ligase D</i>	ATP-sõltuv DNA ligaas D
MMC	<i>mitomycin C</i>	mitomütsiin C
MMR	<i>mismatch repair</i>	DNA valepaardumiste reparatsioon
NER	<i>nucleotide excision repair</i>	nukleotiidi väljalõike reparatsioon
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>	DNA otste mittehomoloogiline ühendamine
NQO	<i>nitroquinoline</i>	nitrokinoliin
Phe	<i>phenol</i>	fenool
Rif	<i>rifampicin</i>	rifampitsiin
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	reaktiivsed hapnikuühendid
Sm	<i>streptomycin</i>	streptomütsiin
ssDNA	<i>single strand DNA</i>	üksikahelaline DNA

## Sissejuhatus

Väliskeskkonnas on bakterirakud pidevalt eksponeeritud stressi tekitavatele teguritele, mille survele toimuvad rakkudes adaptatsioonid. Stressivastusena sisenevad bakterirakud statsionaarsesse faasi, mis ühest küljest suurendab nende vastupanu teatud tüüpi stressoritele, kuid samas muudab vastuvõtlikumaks DNA kahjustustele. Peamised DNA-d kahjustavad tegurid on reaktiivsed hapnikuradikaalid ja ioniseeriv kiirgus, mille toimetel võivad tekkida nii ühe- kui kaheaahelalised DNA katked. Vaid ühest kaheaahelalisest DNA katkest (*double-strand break* - DSB) piisab, et rakud sureksid. Ka üheaahelalised DNA katked (*single-strand break* – SSB) on ohtlikud, kuna nende parandamata jätmine võib samuti viia DSB-de tekkimiseni. Kasvavates rakkudes parandatakse nii DSB-sid kui SSB-sid homoloogilise rekombinatsiooni (*homologous recombination* - HR) mehhanismi abil. Statsionaarses faasis parandatakse DSB-sid DNA otste mittehomoogilise ühendamise (*non-homologous end-joining* – NHEJ) teel, mida viivad prokarüootides läbi valgud Ku ja LigD. Erinevalt HR-st ei ole NHEJ toimumiseks homoloogilise DNA matriitsahela olemasolu vajalik. See omakorda muudab DSB-de parandamise NHEJ abil mutageenseks.

Minu töö eesmärgiks oli uurida NHEJ valkude puudumise ning LigD valgu üleekspressiooni mõju nii statsionaarses faasis kui ka kasvavates rakkudes *Pseudomonas putida* rakkudes toimuvate mutatsioonide tekkele.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 DNA kahjustuste tekkimine bakterirakkudes

Bakterirakud on väliskeskkonnas eksponeeritud mitmetele erinevatele stressi tekitavatele teguritele, nende hulgas UV-kiirgusele, külmumise-sulamise stressile ja kuivamisele, mis tekitavad DNA kahjustusi. Lisaks võivad raku normaalse elutegevuse käigus tekkida vaheühendid, mis samuti põhjustavad genotoksilist stressi. Oksüdatiivsete kahjustustega puutuvad bakterid kokku kõige sagedamini. Reaktiivsed hapnikuvormid (ROS), milleks on vesinikperoksiid, superoksiid ja hüdroksüülradikaalid, võivad tekkida hingamisahela kõrvalproduktidena, ioniseeriva kiirguse või siirdemetallide, keemiliste oksüdantide ja vabade radikaalide mõjul (David jt., 2007). ROS-id kahjustavad lisaks nukleiinhapetele ka valke ning küllastumata ahelaga rasvhappeid.

Erinevat tüüpi stressorite poolt tekitatud DNA kahjustuste parandamiseks on rakkudes mitmed spetsiifilised reparatsioonirajad. Mõned neist kulgevad vigadevabalt, teised aga mutageenselt. Mutatsioonide tekkesagedus hoitakse siiski võimalikult madalana, et tagada geneetilise informatsiooni säilimine rakus. Bakteripopulatsiooni keskkonnamuutustega adapteerumisel võib aga osutuda kõrge mutatsioonisagedus lühiajaliselt kasulikuks, sest sel juhul suureneb ka kasulike mutatsioonide tekke võimalus. Kui aga mutatsioonisagedus jääb pidevalt kõrgeks, kuhjuvad adapteerunud variantidesse kahjulikud mutatsioonid, mis vähendavad nende kohasust ja võivad põhjustada rakkude surma.

## 1.2 DNA kahjustuste reparatsioon

### 1.2.1 Nukleotiidide väljalõikamise reparatsioon NER

NER raja abil eemaldatakse suuremahulisi DNA struktuuri mõjutavaid kahjustusi, kus kahjustatud DNA ahelast lõigatakse välja 12-13 nt pikkuse segment (Truglio jt., 2006). Tüüpilised NER-i substraadid tekivad UV kiirguse või kemikaalide mõjul. Prokarüootides osalevad NER-s valgud UvrA, UvrB ja UvrC. UvrA<sub>2</sub>B valkkompleks tunneb ära kahjustatud koha ning seondub DNA ahelaga (Truglio jt., 2006). UvrB seondumine DNA-ga on vajalik kahjustatud ahela eristamiseks ning järgneva etapi initsieerimiseks. Kui kahjustatud koht on kindlaks määratud, dissotsieerub UvrA ning UvrB-DNA kompleksiga seondub UvrC, mis

kõigepealt lõikab kahjustatud järjestust 3' otsa ja seejärel 5' otsa poolt. Edasi eemaldab UvrD helikaas UvrC koos väljalõigatud DNA ahelaga. UvrB jääb DNA-ga seotuks kuni üheaheelalise tühimiku täidab DNA polümeraas (Truglio jt., 2006). Lõpuks ligeeritab DNA ahelad kokku DNA ligaas.

Lisaks UvrA<sub>2</sub>B kompleksile võib NER raja initsieerida RNA polümeraasi peatumine kahjustuse kohal. Kahjustatud saidiga seondub Mfd valk, eemaldab RNA polümeraasi ja arvatakse, et seejärel seonduvad ahelaga UvrA ja UvrB (Theis jt., 2000) ning NER rada kulgeb nagu juba eelpool kirjeldatud.

### 1.2.2 Aluse väljalõikamise reparatsioon BER

BER on peamine reparatsioonirada, mille abil eemaldatakse väikesemahulisi, DNA ahela struktuuri mittemõjutavaid kahjustusi, nagu näiteks oksüdeeritud, küllastatud, alküleeritud ja deamineeritud lämmastikaluseid, AP-saite ja ka teatud tüüpi valepaardumisi. Nende kahjustuste parandamata jätmine viib spontaansete mutatsioonide tekkimiseni. BER-i valgud on konserveerunud bakteritest eukarüootideni ning BER-i kulgemisel on keskne roll DNA glükosülaasidel, mis lõikavad N-glükosüülidemesse modifitseeritud või kahjustada saanud lämmastikaluse ja deoksüriboosi vahel, mille tulemusel moodustub apürimidiin/apuriin (AP) sait (Gros jt., 2002). AP saite protsessivad edasi AP lüaasse aktiivsusega bifunktsionaalsed glükosülaasid, eraldiseisvad AP lüaasid või AP endonukleasid, tekitades kahjustatud kohale üheaheelalise katke, mille tulemusel moodustuvad 3'-OH rühm ja 5'-deoksüribofosfaat (Marti jt., 2002; Almeida ja Sobol, 2007). BER-il on omakorda kaks alternatiivset rada, millest esimeses piirduakse ühe nukleotiidi asendamisega ja teises eemaldatakse 2 või enam nukleotiidi. Ühes organismis esineb tavaliselt mitmeid erinevaid DNA glükosülaase, millest igal on kindel substraatide eelistus (Marti jt., 2002). Näiteks MutM *E. coli*'s eemaldab põhiliselt 7,8-dihüdroksü-8-oksoguaniini (8-oxoG) C ja A vastast (Michaels jt., 1992), kuid eemaldab ka tsütosiini C/C valepaaridest C/C valepaardumisi (Nakahara jt., 2000). Samas MutY eemaldab adeniine A/G ja A/8-oxoG valepaardumistest ja vähem efektiivselt ka A/C valepaardumistest (Michaels jt., 1992; McGoldrick jt., 1995). 8-oxoG reparatsioonirada on pikemalt kirjeldatud järgnevas alapeatükis.

### 1.2.3 GO reparatsioonirada

Guaniini madal redokspoentsiaal teeb temast ROS-dele kerge märklaua, mistõttu oksüdeeritakse seda üsna sagedasti 7,8-dihüdroksü-8-oksoguaaniiniks (8-oxoG). 8-oxoG vastu võivad DNA polümeraasid sünteesida nii C nukleotiidi kui ka A nukleotiidi, mis viib GC → TA transversioonini (David jt., 2007). Kõigis organismides on olemas reparatsioonirajad 8-oxoG eemaldamiseks nii DNA ahelast kui ka nukleotiidide tagavarast. Prokarüootides viivad seda rada läbi ensüümid MutT, MutM ja MutY. BER glükosülaas MutM lõikab 8-oxoG välja 8-oxoG•C aluspaarist ning teised BER raja ensüümid taastavad G•C aluspaari. Kui aga 8-oxoG-d ei eemaldata enne replikatsiooni ja 8-oxoG vastu lisatakse A nukleotiid, katkestab MutY tekkinud 8-oxoG•A aluspaari ning eemaldab A nukleotiidi (McGoldrick jt., 1995). Tekkinud AP sait parandatakse DNA polümeraasi poolt ning moodustub 8-oxoG•C aluspaar, mis on substraadiks MutM glükosülaasile (David jt., 2007). MutT eemaldab 8-oxo-dGTP nukleotiidide tagavarast, vältides selle lisamist DNA ahelasse (David jt., 2007).

### 1.2.4 DNA valepaardumiste reparatsioon MMR

Paardumata ja valesti paardunud lämmastikalused võivad DNA ahelasse sattuda DNA replikatsioonivigade tõttu, spontaansete või indutseeritud modifikatsioonide esinemisel ja rekombinatsiooni ajal. Sellist tüüpi vigade parandamiseks on *E. coli*'s kirjeldatud MthLS ning teistes organismides sarnast tüüpi reparatsioonirajad, kuigi MthH homoloog enamasti puudub (Marti jt., 2002). Dimeerne valk MutS tunneb ära valepaardumise, seondub DNA-ga ja seob MutL dimeeri ATP-sõltuvalt (Kunkel ja Erie, 2005). MutS(ATP)-MutL-DNA kompleks aktiveerib monomeerse endonukleaasi MthH, mis lõikab DNA ahelas metüleerimata GATC (*dam*) järjetust (Marti jt., 2002). Seejärel keerab helikaas II (UvrD) DNA ahelad lahti, misjärel degradeeritakse üks ahel, olenevalt sellest kummale poole valepaardumist MthH löike tegi, 5' → 3' või 3' → 5' aktiivsusega eksonukleaasi(de) poolt (Kunkel ja Erie, 2005). ssDNA-ga seondub SSB valk (*single-strand binding protein*), mis stabiliseerib DNA üksikahelat ja kaitseb seda degradeerimise eest. Uue DNA ahela sünteesib DNA polümeraas III ja DNA ahelate otsad ligeerib DNA ligaas I (Marti jt., 2002).

Mitmed MutS ja MutL homoloogid on olemas ka eukarüootides, MthH homoloogi



neis aga ei ole, mis viitab sellele, et uue ja vana ahela eristamine toimub seal teisiti kui *E. coli*'s (Marti jt., 2002).

### 1.2.5 Homoloogiline rekombinatsioon HR

Keskkonnategurite mõjul (UV-kiirgus, mutageensed kemikaalid) ja replikatsioonikahvli kollapteerumisel või peatumisel võivad rakkudes tekkida DNA kaksikahelalised katked (*DNA double strand breaks*) DSB-d, mis on rakkudele letaalsed (Dillingham ja Kowalczykowski, 2008). Seega on nii bakterites kui eukarüootides mitmed mehhanismid DSB-de parandamiseks. Bakterites parandatakse kaksikahelalisi katkeid homoloogilise rekombinatsiooni HR-i ja NHEJ (mittehomoloogiline otste ühendamise) abil (Pitcher jt., 2007a). HR kulgemiseks on vajalik homoloogilise DNA järjestuse olemasolu, mis oleks katke parandamisel matriitsahelaks, kuid NHEJ seda ei vaja.

HR rada initsieeritakse *E. coli*'s ja teistes gram-negatiivsetes bakterites RecBCD, gram-positiivsetel bakteritel aga heterodimeerse AddAB kompleksi abil (Dillingham ja Kowalczykowski, 2008). RecBCD seondub katkenud DNA otsale ning liigub ahelal edasi RecB ja RecD subühikute abil, mis ühtlasi omavad ka helikaasset aktiivsust (Wigley, 2012). RecB subühikul on lisaks nukleaaasne aktiivsus, mille abil degradeeritakse mõlemaid lahtikeeratud DNA ahelaid (Wigley, 2012). RecC subühik otsib 3' üleulatuva otsaga ahelal Chi järjestust, milleni jõudes RecBCD kompleks peatub ning selle aktiivsus muutub (Dillingham ja Kowalczykowski, 2008). Helikaasid töötavad seejärel edasi poole aeglasemalat kui enne ning eelistatult hakatakse degradeerima 5' otsaga ahelat, mille tagajärjel tekib 3' üleulatuva ots (Dillingham ja Kowalczykowski, 2008). Seejärel aitab RecB nukleaaasi domeen 3' otsaga ssDNA-le kinnituda RecA monomeeridel, mille tulemusel moodustub nukleoproteiini filament (Dillingham ja Kowalczykowski, 2008). Seejärel RecBCD dissotsieerub DNA ahelalt. RecA aitab leida homoloogilise järjestusega DNA ahela (tüüpiliselt teiselt kromosoomi koopialt, kui rakus on rohkem kui üks kromosoomi koopia) ning vahendab ahelate vahetust homoloogiliste piirkondade vahel. Paardumata doonorahelast moodustub D-ling, mille eemaldavad nukleaaasid. DNA ahelate ristumise tagajärjel tekkinud Holliday ühendused katkestatakse pärast DNA sünteesi RuvABC või RecG nukleaaaside poolt, taastades kaks eraldiseisvat DNA kaksikahelat. Katked ligeerib DNA ligaas (Dillingham ja Kowalczykowski, 2008).

ssDNA tühimikud võivad tekkida DNA replikatsiooni häiretel või DNA

reparatsiooniensüümide toimetel ning need parandatakse RecF raja ensüümide abil (Dillingham ja Kowalczykowski, 2008).

### 1.2.6 Mittehomoloogiline DNA otste ühendamine bakterites

Pikka aega arvati, et prokarüootides parandatakse DSB-d vaid HR-i abil ning NHEJ rada peeti vaid eukarüootidele omaseks. Seda põhjusel, et populaarses mudelorganismis *E. coli*'s NHEJ valgud puuduvad (Lieber, 2010). Hiljuti leiti aga ka prokarüootide genoomist *in silico* järjestuste otsingul NHEJ raja võtmevalgu Ku ortoloog ning lisaks on kirjeldatud ka mitmeid ATP-sõltuvaid ligaase, mis osalevad samuti NHEJ rajas (Aravind ja Koonin, 2001; Doherty ja Weller, 2001). Nii eukarüootides kui ka prokarüootides on NHEJ valgud väga paindlikud, võimaldades parandada erinevate otstega DNA katkeid (Lieber, 2010).

Prokarüootides on NHEJ rada katalüüsitud valkude Ku ja LigD poolt (Weller jt., 2002). NHEJ toimumiseks pole homoloogilise ahela olemasolu vajalik, kuigi on näidatud, et DNA ahelate joondamiseks võidakse kasutada mikrohomoloogiat (Della jt., 2004). Seega saab NHEJ toimuda erinevalt HR-st ka olukorras, kus kromosoomist on olemas vaid üks koopia (Shuman ja Glickman, 2007). Ku ja LigD defektsete bakteritüvedega on näidatud, et NHEJ pole aktiivselt jagunevates rakkudes hädavajalik ning selle raja abil parandatakse DSB-sid peamiselt statsionaarses faasis (Korycka-Machala jt., 2006; Stephanou jt., 2007; Shuman ja Glickman, 2007). Paljudes bakterites NHEJ rada puudub. Samas on *E. coli*'s kirjeldatud alternatiivne DNA otste ühendamise rada (A-EJ), mis töötab NHEJ raja valkudest Ku ja LigD sõltumatult (Chayot jt., 2010), viidates sellele, et lisaks HR-le vajavad bakterid ka varumehhanisme DNA katkete parandamisel. Algselt arvati, et ka arhedes puudub klassikaline NHEJ, kuid nüüdseks on näidatud *in silico* ja *in vitro*, et ka nendes organismides on olemas NHEJ valkude homoloogid (Nair jt., 2010; Bartlett jt., 2013). Mehhanism, kuidas bakterid on omandanud NHEJ valgud ning millises vormis, on veel selgusetu. Vastavad geenid võisid liikuda bakterite genoomi horisontaalse geeniülekanega või olid algselt olemas ja läksid evolutsiooni käigus mõnedes bakterites kaduma (Aravind ja Koonin, 2001).

Bakteriaalsete Ku ja LigD osalust NHEJ rajas on kõige elegantsemalt näidatud lineariseeritud plasmidi katsetega. Selektiivsuse markereid sisaldav nukleasidega töödeldud plasmiid viidi *M. tuberculosis*'e ja *M. smegmatis*'e rakkudesse ning selektiivsöötmetel kasvama hakanud rakud viitasid plasmidi retsirkulariseerimisele (Della jt., 2004; Korycka-Machala jt., 2006; Aniukwu jt., 2008). Selgus, et plasmidi ligeerimine on mutageenne ning

mutatsioonispektris esines nii insertsioone kui ka deletsioone (Gong jt., 2005). Ku ja LigD deleteerimisel plasmidi ligeerimise efektiivsus langeb, kuid täpsus tõuseb (Gong jt., 2005).

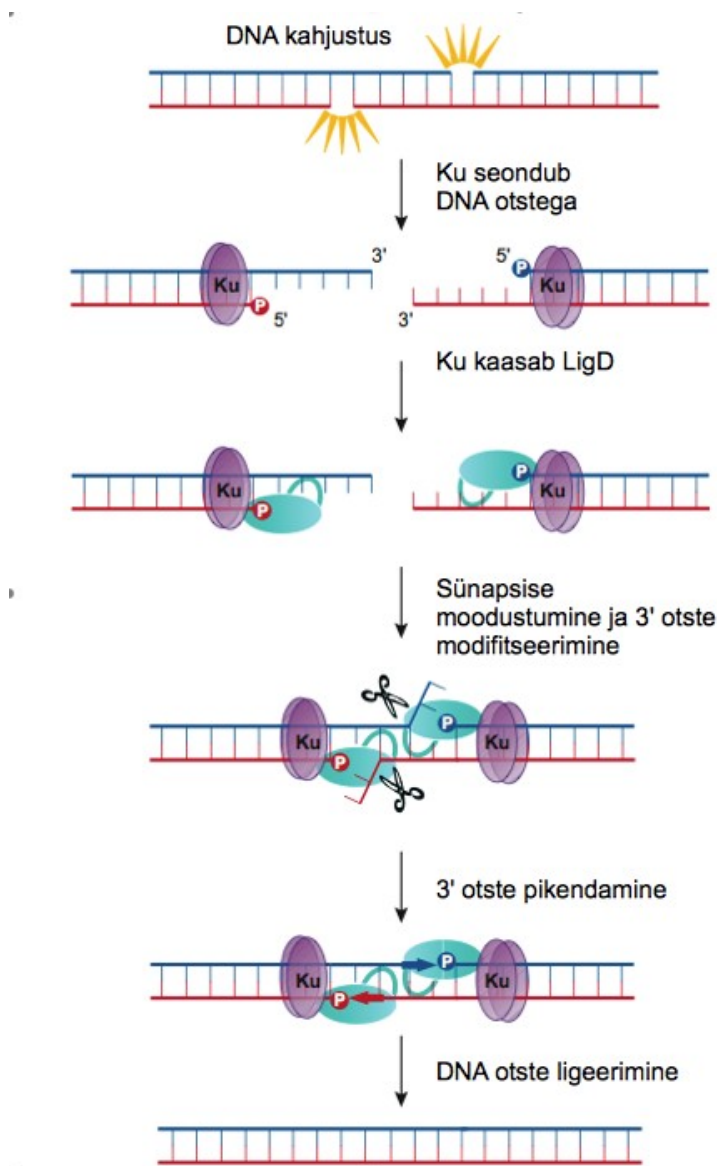
Üheks NHEJ tekkimise põhjuseks bakterites võiks olla see, et bakterid veedavad suurema osa ajast kasvu limiteerivate tingimuste tõttu statsionaarses faasis ning peavad seega toime tulema külmumisest, UV-kiirgusest, kuivusest, kuumusest ja ROS-de poolt tekitatud DNA kahjustustega (Bowater ja Doherty, 2006; Brissett ja Doherty 2009; Lieber, 2010). Väliskeskkonnas elutsevad bakterid nagu näiteks *Pseudomonas putida* ja *Mycobacterium smegmatis*, on eksponeeritud keskkonnatingimustele (kuumuse ja külmumise tõttu kuivamine), mis põhjustavad pikaajalist dehüdratatsiooni ning rakkude kuivamist (Pitcher jt., 2007b). On näidatud, et statsionaarses kasvufaasis *M. smegmatis*'e rakud on Ku ja LigD valkude puudumisel ioniseerivale kiirgusele ja kuivamisele tundlikumad kui kasvavad rakud (Pitcher jt., 2007b; Stephanou jt., 2007). Looduses ei puutu bakterid kokku laboris kasutatavate ülisuurte kiirgusdoosidega, kuid on näidatud, et väliskeskkonnast isoleeritud bakterid, mis on vastupidavad kuivamisele, on resistentsed ka ioniseerivale kiirgusele ning *Deinococcus radiodurans*'is põhjustavad kuivatamine ja kiiritamine samaväärsel hulgal DSB-sid (Mattimore ja Battista, 1996). Seega võiks üks NHEJ füsioloogiline roll prokarüootides olla kuivusest põhjustatud DSB-de parandamine statsionaarse faasi rakkudes (Pitcher jt., 2007b).

Toitainete limitatsioonil keskkonnas moodustavad teatud bakteriliigid (nt. *Bacillus*) spore, et kaitsta latentset rakku keskkonna kahjulike mõjude eest. Sealjuures on oluline säilitada genoomi stabiilsus ja terviklikkus, et sobivate tingimuste tekkides võiksid spoorid idanema ning poolduma hakata. *Bacillus subtilis*'e spoorid, kus puuduvad NHEJ valgud, on ülitundlikud DSB-sid tekitavate tegurite suhtes (Moeller jt., 2007). Lisaks muutub *B. subtilis*'es eelspoori staadiumis NHEJ geenide ekspressioon aktiivseks (Wang jt., 2006). Katsetega on näidatud, et *ykoU* (*ligD*) ja *ykoV* (*ku*) geenide suhtes defektsete tüvede spoorid on tundlikumad UV-kiirgusele, radioaktiivsele kiirgusele ning ultrakõrge vaakumi abil tekitatud kuivamisele (Moeller jt., 2007).

NHEJ rada võib olla oluline patogeensete bakterite ellujäämiseks peremeesorganismis (Stephanou jt., 2007). *M. tuberculosis*'e rakud võivad aastaid püsida makrofaagides latentsses faasis, säilitades infektsioonivõime vaatamata sellele, et nad on pideva genotoksilise rünnaku all (Pitcher jt., 2007b; Wilson jt., 2003). Katsed mutantsete *M. tuberculosis*'e tüvedega viitavad sellele, et peremeesorganismi genotoksilise rünnaku poolt initsieeritud vigaderohke DNA reparatsioon patogeensetes bakterites võib viia antibiootikumide resistentsuse tekkimiseni (Shuman ja Glickman, 2007). Lisaks on näidatud, et peremeesraku LigD valku

kasutavad oma genoomi tsirkulariseerimiseks ka mükobakteriofaagid (Pitcher jt., 2006).

Järgnevalt kirjeldan lähemalt NHEJ toimumist, mida illustreerib joonis 1. Bakteriaalne kahekomponentne NHEJ on piisav selleks, et tuua DSB otsad omavahel kokku, need protsessida ja ligeerida (Pitcher jt., 2007a). Kõigepealt lokaliseerib Ku valk DSB asukoha ja seondub katke 3'-üleulatuvatele otstele. Seejärel kaasab Ku valk multifunktsionaalse ensüümi LigD, millel on lisaks DNA ligaassele aktiivsusele ka polümeraasi ja fosfoesteraasi aktiivsused (Brissett ja Doherty 2009). LigD seondumine Ku valguga toimub LigD polümeraasi domeeni vahendusel, mille abil tunneb ta ära DNA ahela otsas oleva 5'- fosfaadi ning sellega seondudes vahendab koos Ku-ga sünapsi teket. Sõltuvalt katkemisel tekkinud DNA otste struktuurist protsessitakse DNA otsi LigD fosfoesteraasse aktiivsuse abil ja sünteesitakse DNA ahel polümeraasse aktiivsuse abil (Pitcher jt., 2007a). Enamasti vajavad kiirguse ja nukleaside poolt tekitatud DSB-de otsad modifitseerimist, et tekiks ligaasile sobilik substraat.



Joonis 1. NHEJ raja mehhanism. Ku valk seondub DSB-le kaasates multifunktsionaalse ensüümi LigD, millel on lisaks DNA ligaassele aktiivsusele ka fosfoesteraasne ja polümeraasne aktiivsus. Fosfoesteraasse aktiivsuse abil degradeeritakse üleulatuvad DNA otsad, polümeraasse aktiivsuse abil sünteesitakse puuduv ahel ning ligaasse aktiivsuse abil ligeeritakse DNA otsad. Joonis on võetud ja muudetud artiklist Pitcher jt., 2007a.

### **1.2.6.1 Ku valk**

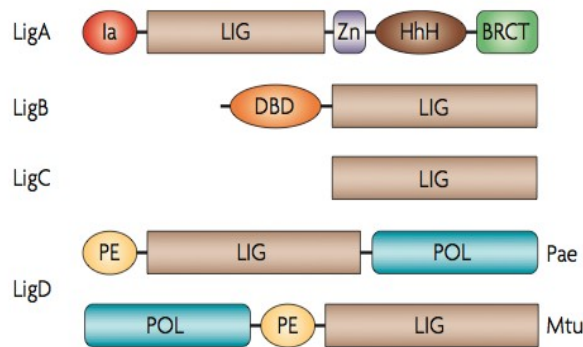
Ku on prokarüootidel ~30-40 kDa homodimeerne, eukarüootidel ~70-85 kDa heterodimeerne valk. Bakteritel on Ku homoloogid enamasti üksikute geenidena, kuigi leidub ka erandeid. Näiteks on *Sinorhizobium meliloti*'s neli Ku homoloogi (Kobayashi jt., 2008). Ku valgul on konserveerunud tsentraalne dimerisatsiooni ja DNA sidumise piirkond (Aravind ja Koonin, 2001). Ku dimeeridest moodustub rõngakujuline struktuur, läbi mille kulgeb DNA ahel. Ku valgud võivad koguneda lineaarsele dsDNA-le, liikudes passiivselt mööda DNA-d (Weller jt., 2002).

Ku tunneb spetsiifiliselt ära kaheaahelalise DNA ja seondub DSB tekkimisel dsDNA otstega ning takistab nukleasidel DNA degradeerimist (Zhu ja Shuman, 2010). Prokarüootses NHEJ rajas on Ku ülesandeks siduda DNA-le LigD ning fikseerida dsDNA ahelad. Lisaks on näidatud, et bakteris *P. aeruginosa* stimuleerib Ku ribonukleotiidide lisamist LigD polümeraasse ja katke ligeerimist ligaasse aktiivsuse abil (Zhu ja Shuman, 2010). Seega lisab Ku LigD-le protsessiivsust.

### **1.2.6.2 DNA ligaasid bakterirakkudes**

Bakterites esinevad NAD<sup>+</sup>-sõltuvad ja ATP-sõltuvad ligaasid. LigA on NAD<sup>+</sup> - sõltuv ligaas, mis osaleb peamiselt Okazaki fragmentide ligeerimisel ning on olemas kõigis bakterites (Doherty ja Weller, 2001; Gong jt., 2004). LigA koosneb ligaasi domeenist, mis külgneb NAD<sup>+</sup> - äratundva domeeniga, ja juuksenõel-heeliks (HhH) ning BRCT domeenidest (Joonis 2) (Gong jt., 2004). LigA ligeerib ainult 3' üleulatuvaid DNA otsi (Aniukwu jt., 2008).

Erinevate ATP-sõltuvate ligaaside arv erineb bakterites liigiti. *M. smegmatis*'es on neid näiteks 4, kuid *P. aeruginosa*'s 2. ATP-sõltuvad ligaasid võivad koosneda ühest või mitmest domeenist (Doherty ja Weller, 2001). Tavaliselt on NHEJ-spetsiifiline LigD multidomeenne ning ülejäänud ATP-sõltuvad ligaasid koosnevad vaid ühest katalüütilisest subühikust (Shuman ja Glickman, 2007).



Joonis 2. DNA ligaasid bakterites ja nende domeenide asetus. Mtu - *M. tuberculosis*, Pae - *P. aeruginosa*. Joonis on võetud artiklist Shuman ja Glickman, 2007.

### 1.2.6.3 LigD valk

Erinevalt teistest ATP-sõltuvatest ligaasidest on LigD paljudes bakteriliikides multidomeenne valk, koosnedes ligaasi, fosfoesteraasi ja polümeraasi domeenidest. Domeenide omavaheline asetus varieerub liigiti. *P. aeruginosa*'s ja *Agrobacterium tumefaciens*'is asetseb N-terminuses ligaasi domeen (LigDom), keskel fosfoesteraasi domeen (PeDom) ja C-terminuses polümeraasi domeen (PolDom) (Pitcher jt., 2007a) (Joonis 1). *M. smegmatis*'es ja *M. tuberculosis*'es asetseb PolDom N-terminuses, PeDom keskel ning LigDom C-terminuses (Pitcher jt., 2007a) (Joonis 1). *B. subtilis*'e LigD-1 (YkoU) PeDom puudub ning PolDom on seotud LigDom-i C-terminusega (Pitcher jt., 2007a). Mõnedes bakterites on LigD ühe polüpeptiidina, kuid teistes (näiteks termofiilsetes liikides) on kõik domeenid eraldi polüpeptiididena.

LigD PolDom ja LigDom võivad *in vitro* seonduda DNA-ga, kusjuures suurema afiinsusega teeb seda LigDom (Pitcher jt., 2005). Efektiivseks NHEJ toimumiseks on siiski vajalik interaktsioon Ku-ga.

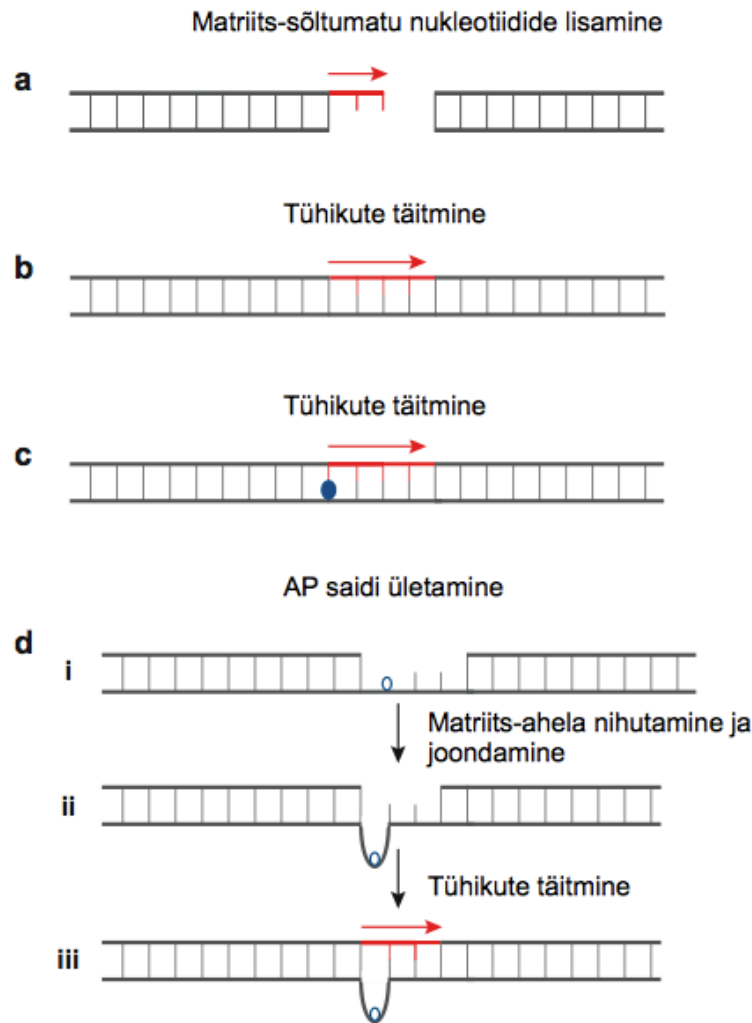
NHEJ raja mutatsioonispekter sõltub sellest, millised DNA otsad moodustuvad DSB tekkel (Aniukwu jt., 2008). Lineariseeritud plasmidi transfekteerimisel bakterirakkudesse ilmnes, et tõmpidele DNA otstele lisatakse NHEJ käigus tavaliselt 1 nukleotiid, 3' üleulatuvate otste puhul kulgeb rada vigadevabalt, 5' üleulatuvate otste puhul vigaderohkelt ning ka üheaahelalisi DNA otsi modifitseeritakse enne ligeerimist (Gong jt., 2005). Lisaks on näidatud, et LigD defektses *M. smegmatis*'es lineariseeritud plasmidi parandamise efektiivsus väheneb, kuid täpsus suureneb (Gong jt., 2005). *M. smegmatis*'es võib LigD valgu puudumisel

NHEJ läbiviimisel osaleda LigC, kuid mitte LigB (Gong jt., 2005). Mõnedes bakterites, nagu näiteks *P. aeruginosa*, aga LigC valk puudub.

**Polümeraasne domeen (PolDom).** LigD valgu PolDom on esimene näide AEP-dest (arhede ja eukarüootide primaasid) bakterites (Shuman ja Glickman, 2007). Primaasid on võimelised initsieerima replikatsiooni, sünteesides kahest nukleotiidist koosneva produkti, mis seejärel elongeeritakse 14 ribonukleotiidi abil. RNA ahela otsa moodustunud 3'-OH rühm on vajalik replikatiivsetele DNA polümeraasidele edasiseks DNA ahela pikendamiseks, kuna need ensüümid ei ole võimelised initsieerima DNA ahela sünteesi *de novo*. Samas ei ole just sellele aktiivsusele NHEJ raja puhul funktsiooni leitud (Pitcher jt., 2007a).

Lisaks primaassele aktiivsusele on PolDom-il veel mitmeid matriits-sõltuvaid ja -sõltumatuid nukleotidüültransferaasseid aktiivsuseid (Zhu ja Shuman, 2005; Yakovleva ja Shuman, 2006):

1. matriits-sõltumatu terminaalne transferaas – võib lisada nukleotiide ssDNA-le või tõmpide otstega dsDNA-le matriits-sõltumatult (joonis 3a)
2. DNA-sõltuv RNA/DNA üheaahelalist tühikut täitev polümeraas (joonis 3b)
3. lisab nukleotiidi 8-oxoG vastu ja sünteesib seejärel matriits-sõltuvalt 3' ahela lõpuni (joonis 3c)
4. ületab AP saidi, moodustades DNA ahelasse lingu ja seejärel nihutab ning joondab matriits-ahela uuesti, et viia DNA süntees lõpuni (joonis 3d)



Joonis 3. LigD PolDom erinevad nukleotidüültransferaasid aktiivsused. Joonis on võetud ja muudetud artiklist Pitcher jt., 2007a.

Eelistatult lisab PolDom kõigi eelpool loetletud protsesside läbiviimisel ahelasse ribonukleotiide, mis võib olla kasulik dNTP-de limitatsioonil, näiteks statsionaarses faasis (Gu ja Lieber, 2008; Pitcher jt., 2007a). rNTP-de lisamine DNA ahelasse ei ole rakkudele letaalne ning on võimalik, et aktiveeritakse mõne teise DNA reparatsiooniraja valgud ning ahel parandatakse veelkord.

Aniukwu jt. (2008) näitasid mükobakteris, et PolDom-i deleteerimisel sarnaneb fenotüüp tüvele, milles on LigD täielikult deleteeritud. Seega võib PolDom-il olla lisaks polümeraasele aktiivsusele roll ka sünaptsise moodustamisel.

**Ligaasne domeen (LigDom).** DNA ahelate ligeerimine toimub kolmeetapiliselt (Tomkinson jt., 2006):

1. ligaas moodustab ATP-ga reageerides ensüüm-adenülaat kompleksi



2. adenüleeritud ligaasilt kantakse aktiveeritud AMP katkenud DNA ahela 5' fosfaatrühmale
3. 3'-hüdrosüülrühm teiselt DNA otsalt käitub nukleofiilina, atakeerides fosfoanhüdriidi ja AMP käitub lahkuva rühmana, et ligeerimine lõpetada

Mükobakterites on näidatud, et LigD ligaasi domääni olemasolu ei ole NHEJ raja toimumiseks oluline ning selle funktsiooni võib NHEJ rajas asendada LigC valk (Gong jt., 2005; Aniukwu jt., 2008).

**Fosfoesteraasne domään PeDom.** LigD PeDom-l on ribonukleaasne, 3'-fosfomonoesteraasne ja 3'-fosfodiesterasne aktiivsus, mis on stimuleeritud kahevalentsete metalliioonide poolt (Mg, Mn) (Della jt., 2004; Natarajan jt., 2011; Bartlett jt., 2013). PeDom võib seega osaleda NHEJ varajastes etappides näiteks nukleolüütilisel lõikamisel, ioniseeriva kiirguse mõjul ja ka BER-i kulgemisel tekkinud 3'-PO<sub>4</sub> DNA otste modifitseerimisel (Shuman ja Glickman, 2007). Teiseks võib PeDom eemaldada 3' DNA ahela otsast PolDom poolt lisatud ribonukleotiide, jättes alles ühe rNTP, mille abil saavad ligaasid katke ligeerida (Zhu ja Shuman, 2008). Seega vastutab PeDom NHEJ hilistes etappides PolDom tekitatud kahjulike DNA intermediaatide elimineerimise eest (Bartlett jt., 2013). Kuigi PeDom võib ahelalt eemaldada rohkem kui ühe terminaalsete ribonukleotiidi, teeb ta seda suurema tõenäosusega mononukleosiidide, mitte dinukleotiidide kaupa (Zhu ja Shuman, 2008).

### 1.3 Statsionaarse faasi mutagenees bakterites

Kasvu limiteerivates tingimustes indutseeritakse paljudes bakterites üldine stressivastus, mis on kontrollitud ja reguleeritud sigma faktori RpoS ( $\sigma^s$ ) poolt. Sigma faktor on RNA polümeraasi (RNAP) subühik, mis juhib RNA polümeraasi teatud tüüpi promootoritele. Kasvavates rakkudes on RNAP seotud RpoD-ga ( $\sigma^{70}$ ), kuid statsionaarses faasis RpoS-ga ning rakkudes hakatakse transkribeerima geene, mis on vajalikud stressitingimustes ellujäämiseks (Foster, 2007). RpoS-i süntees ja akumulatsioon on reguleeritud nii transkriptsiooni, translatsiooni kui ka proteolüüsi tasemel (Battesti jt., 2011; Foster, 2007). Üks peamistest regulaatoritest, mida hakatakse rakkudes sünteesima toitainete limitatsioonil, on alarmoon (p)ppGpp. (p)ppGpp ja RpoS poolt indutseeritud stressivastused kattuvad omavahel suures ulatuses (Battesti jt., 2011). RpoS-ga samaaegselt reguleerivad stressivastust ka teised sigma faktorid ning selle tulemusel muutuvad kasvuarrestis olevad rakud vastupidavamaks ka sekundaarsetele stressoritele. Sigma faktorite konkureerimine võimaldab transkriptsiooni reguleerida vastavalt keskkonnatingimustele (Nyström, 2004).

Statsionaarse faasi populatsioonis jagunevad rakud väga aeglaselt, kui üldse. Ometi tekib neis mutatsioone, millest mõned võimaldavad bakteritel paremini keskkonnaga kohastuda (Foster, 2007). Selliseid mutatsioone nimetatakse statsionaarse faasi mutatsioonideks (Foster, 2007; Rosenberg ja Hastings, 2004). Statsionaarse faasi mutatsioonide teke on seotud vigu tegevate (EP – *error prone*) DNA polümeraaside (DNAP) ekspressiooni aktiveerimisega ja osalemisega DNA sünteesil ning DNA reparatsiooniradades osalevate ensüümide vähenenud ekspressiooniga (näiteks MMR ensüümid) olukorras, kus DNA replikatsiooni tase rakkudes on oluliselt langenud (Brégeon jt, 1999; Layton ja Foster, 2003). EP DNAP-d võivad kopeerida kahjustatud DNA ahelat, lisada DNA ahelasse  $10^{-1}$  kuni  $10^{-3}$  sagedusega vale nukleotiidi aluspaari kohta ja kasutada DNA sünteesil kahjustatud otstega või valesti paardunud praimerit (Goodman, 2002). Ühelgi neist ensüümidest ei ole 3'-eksonukleaasset *proofreading*-aktiivsust ja lisaks näitavad EP DNAP-de kristallstruktuuride uuringud, et nende aktiivsaite struktuur ei ole nii jäik, kui replikatiivsetel DNAP-del, mis võimaldabki siduda mittekanoonilisi ja kahjustatud nukleotiide (Nohmi, 2006). EP DNAP-e tuntakse ka Y perekonna polümeraaside nime all. Gram-negatiivsetes bakterites on enamasti kaks EP DNA polümeraasi: Pol IV (UmuDC) ja Pol V (DinB). *E. coli* statsionaarse faasi rakkudes on RpoS-sõltuvast stressivastusest tingituna suurenenud vigutegeva DNA polümeraasi Pol IV ekspressioon ning repressseeritud MMR-i läbiviivate geenide ekspressioon

(Saint-Ruf ja Matic, 2006). Lisaks kaitseb vigutegevaid polümeraase Pol IV ja Pol V degradeerimise eest kuumašoki vastusena sünteesitud abivalk GroE (Foster, 2007). *P. putida* pikka aega nälginud bakteripopulatsioonis on Pol IV samuti seotud mutatsioonide tekkega. Samas on selle polümeraasi liigne ekspressioon rakkudele letaalne (Tegova jt., 2004). TOL plasmiidilt pWW0 kodeeritud Pol V homoloog suurendab statsionaarses faasis *P. putida* rakkude kohastumist näljastressiga (Tark jt., 2005). Lisaks on näidatud, et EP polümeraaside puudumisel ei teki rakkudes GASP (*growth advantage in stationary phase*) mutatsioone *E. coli* rakkudes (Yeiser jt., 2002).

Paljude bakterite genoomis, sealhulgas ka pseudomonaadide genoomis, puudub Pol V. Selle asemel on nende bakterite kromosoomis geenikassett, millelt on kodeeritud Y perekonna valkudele sarnane ImuB ja DNA Pol III katalüütilise subühiku homoloog DnaE2 (Abella jt., 2004). Kuigi DnaE2 seostatakse üldiselt mutageense DNA sünteesiga (Boshoff jt., 2003; Galhardo jt., 2005), viitavad meie laboris läbi viidud uuringud sellele, et bakteris *P. putida* DnaE2 pigem vähendab mutatsioonide tekkesagedust *P. putida* statsionaarse faasi rakkudes (Koorits jt., 2007).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Varem ei ole näidatud, et Ku ja LigD osalevad lisaks NHEJ läbiviimisele ka muudes rakus toimuvates protsessides. Samas on spekuleeritud, et NHEJ mutageensusel võib olla oluline roll statsionaarses faasis toimuvate mutatsioonide tekkel (Pitcher jt., 2007a). Arvatakse, et kasvavates rakkudes on Ku ja LigD ainuke ülesanne lineaarse plasmidi retsirkulariseerimine ja statsionaarses faasis peamiselt DSB-de parandamine.

Minu ülesandeks sai konstrueerida LigD deletsioonitüvi ja LigD üleekspressioonitüvi ning uurida, kas LigD võiks osaleda kasvavates rakkudes või statsionaarses faasis olevates *P. putida* rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides. Uurisime ka Ku valgu puudumise mõjusid mutatsiooniprotsessidele, et selgitada, kas LigD võimalik osalus statsionaarse faasi mutatsioonide tekkel on NHEJ-sõltumatu. Lisaks uurisime, kuidas mõjutab statsionaarse faasi sigma faktor RpoS LigD osalust statsionaarse faasi mutageneesil ning ka seda, mis tüüpi mutatsioonide teket võiks LigD statsionaarse faasi rakkudes põhjustada. Veel tahtsime teada, kas DSB-sid tekitavate kemikaalide tundikkus suureneb kasvavates rakkudes NHEJ valkude puudumisel.

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 Söötmed, bakteritüved, plasmiidid

Täissöötmena kasutasime Luria-Bertani söödet (Miller, 1972) (1,0% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 1,0% naatriumkloriid, pH 7). Minimaalsöötme valmistasime M9 baasil (Adams, 1959), lisades mikroelemente (2,5 ml/l) (Bauchop ja Elsdon, 1960), süsinikuallikana kas glükoosi (Glc, lõppkontsentratsiooniga 10 mM) või fenooli (Phe, lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM) ning vajadusel aminohapete hüdrokülaati (CAA, lõppkontsentratsiooniga 0,2%). Tardsöötme valmistamiseks lisasime söötmele agarit (15 g/l).

Bakteritüvede ja plasmiidide seleksiooniks kasutasime antibiootikume: ampitsilliini (Amp; 0,1 mg/ml), karbenitsilliini (Cb; 1-3 mg/ml), tetratsükliini (Tet; 10-50 ) ja kanamütsiini (Km; 0,05 mg/ml).

*P. putida* tüvesid kasvasime temperatuuril 30°C ja *E. coli* tüvesid temperatuuril 37°C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisime kultuure loksutil (180 pööret/min). Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

Bakteritüvi või plasmiid	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (f80 lacZΔM15) recA1 endA1hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
DH5αλpir	DH5α, mis sisaldab λpir lüsogeeni	
CC118λpir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Am)</i>	Herrero jt., 1990
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3 (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) recA13 proΔ2 lacY1galK2 rsp20 xyl-5 mtl-1</i>	Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	<i>P. putida</i> algne tüvi	Bayley jt., 1977
ligDsm	<i>ligD::Sm</i>	S. Sarv, bakalaureusetöö 2010
ku	<i>Δku</i>	K. Mikk, avaldamata andmed
ligDsmku	<i>ligD::Sm Δku</i>	K. Mikk, avaldamata andmed
rpoS	<i>rpoS::Km</i>	Ojangu jt., 2000
rpoSligDsm	<i>rpoS::Km ligD::Sm</i>	S. Sarv, bakalaureusetöö 2010
rpoSku	<i>rpoS::Km Δku</i>	käesolev töö
ΔligD	<i>ΔligD</i>	käesolev töö
ΔligDku	<i>ΔligD Δku</i>	käesolev töö
recA	<i>recA::Tet</i>	Tegova jt., 2004
recAΔligD	<i>recA::Tet ΔligD</i>	käesolev töö
recAku	<i>recA::Tet Δku</i>	K. Mikk, avaldamata andmed
recAΔligDku	<i>recA::Tet ΔligD Δku</i>	käesolev töö
ligDsm+D	ligDsm tüvi, mis sisaldab pBAM koosseisus <i>lacI-P<sub>lac</sub>ligD</i> geenikasseti (Km <sup>r</sup> )	käesolev töö
ΔligD+D	ΔligD tüvi, mis sisaldab pBAM koosseisus <i>lacI-P<sub>lac</sub>ligD</i> geenikasseti (Km <sup>r</sup> )	käesolev töö
Plasmiidid		
pBAM1	plasmiid, mis kannab minitransposooni mini-Tn5 Km <sup>r</sup> (Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> )	Martinez-Garcia jt., 2011

pBAMlacItac	<i>lacI-P<sub>tac</sub></i> geenikassett (Km <sup>r</sup> ) kloonitud vektorisse pBAM	H. Ilves, K. Mikk, avaldamata andmed
pBAMlacItacligD	<i>ligD</i> geen kloonitud vektorisse pBAMlacItac	käesolev töö
pJP5603	homoloogiliseks rekombinatsiooniks kasutatav plasmiid, mis sisaldab MCS piirkonna alguses ja lõpus I-SceI lõikesaite, (Km <sup>r</sup> )	Penfold ja Pemberton, 1992
pJPligDTS1TS2	ligDTS1TS2 EcoRI-BamHI fragment kloonitud vektorisse pJP5603	käesolev töö
pJPkuTS1TS2	kuTS1TS2 EcoRI-BamHI fragment kloonitud vektorisse pJP5603	K. Mikk, avaldamata andmed
pSW(I-SceI)	abiplasmiid, mis kannab I-SceI geeni (Cb <sup>r</sup> )	Wong ja Mekalanos, 2000
pKTpheA22TAG	pKT240, mis kannab pheA geeni, milles on CTG koodoni (Leu-22) asemel TAG stopp-koodon	Tegova jt., 2004
pGP704L	homoloogiliseks rekombinatsiooniks kasutatav plasmiid (Amp <sup>r</sup> )	Pavel jt., 1994
pGP704recA::Tet	pGP704L, mis kannab tetratsükliini resistentsusgeeni katkestatud <i>recA</i> geeni	Tegova jt., 2004
pUTrpoS::Km	pUT, mis kannab kanaütsiini resistentsusgeeni katkestatud <i>recA</i> geeni	Ojangu jt., 2000
pRK2013	abiplasmiid konjugatsioonil (Km <sup>r</sup> )	Figurski ja Helinski, 1979

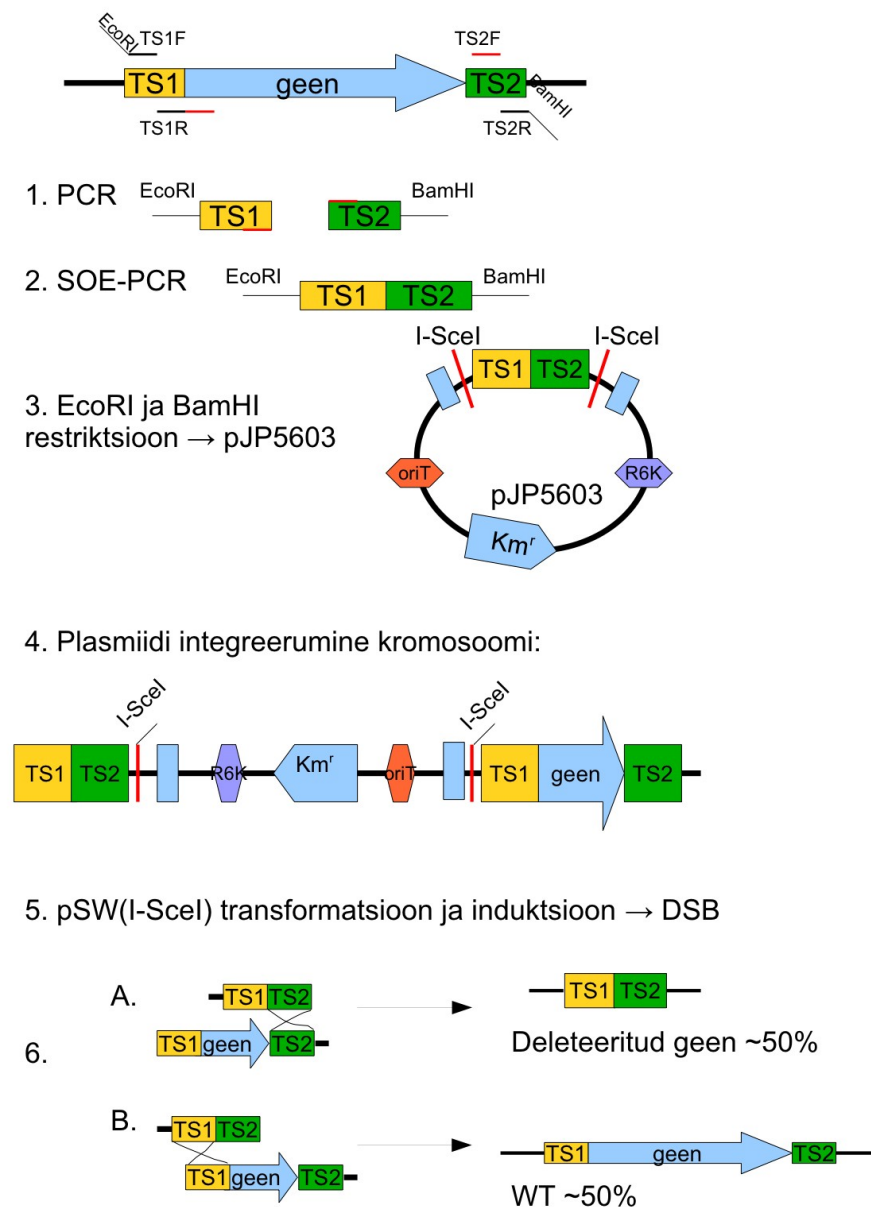
### 2.2.2 *ligD* ja *ku* geenide suhtes defektsete *P. putida* tüvede konstrueerimine

Geenide deleteerimise strateegia on toodud joonisel 5. Selleks, et konstrueerida *ligD* geeni suhtes defektne *P. putida* tüvi, amplifitseerisime PCR meetodil *P. putida* tüvest PaW85 *ligD* geeni 5' otsale eelnevalt alalt 560 aluspaari pikkuse DNA fragmendi (TS1), kasutades selleks praimereid ligDTS1F ja ligDTS1R (tabel 2) ning *ligD* geeni 3' otsale järgnevalt alalt 603 aluspaari pikkuse DNA fragmendi (TS2), kasutades selleks praimereid ligDTS2F ja ligDTS2R (Tabel 2). Praimeri ligDTS1R disainisime nii, et selle 5' otsas olev järjestus on täielikult komplementaarne praimeri ligDTS2F järjestusega, mis on vajalik DNA fragmentide TS1 ja TS2 ühendamiseks SOE (*splice overlap extension*)-PCR (Horton jt., 1989) abil. SOE-PCR läbiviimiseks kasutasime praimereid ligDTS1F ja ligDTS2R, saades 1163 aluspaari pikkuse DNA fragmendi (TS1-TS2).

Amplifitseeritud TS1-TS2 fragmendi kloonisime EcoRI ja BamHI fragmendina plasmidi pJP5603, mille eelnevalt avasime samade restriktasididega. Saadud plasmidi nimetasime pJPligDTS1TS2. Plasmidi viisime *P. putida* rakkudesse elektroporatsiooni abil. Kuna plasmiid pJP5603 ei ole võimeline *P. putida* rakkudes replitseeruma, said Km sisaldaval

selektiivsöötmele kasvama hakata ainult kointegraadiga transkonjugandid. Edasi viisime elektroporatsiooni teel  $Km^r$  rakkudesse vektori pSW-(I-SceI) ning inkubeerisime rakke üleöö LB vedelsöötmes, millele lisasime m-toluaati (1,5 mM lõppkontsentratsioon), et indutseerida plasmiidilt nukleaasi I-SceI ekspressioon. See on vajalik selleks, et kromosoomist delegeerida plasmiid pJP5603. Kointegraadi kadumise kontrollimiseks plaatisime rakud paralleelselt  $Km^r$ -i ja karbenitsilliini (Cb) sisaldavale LB söötmele. Rakud, millest I-SceI kointegraadi välja lõikab, ei ole võimelised  $Km$  sisaldaval söötmele kasvama. Cb sisaldaval söötmele saavad kasvada rakud, milles on olemas plasmiid pSW ( $Cb^r$ ).  $Cb^r / Km^r$  kolooniaid kasvasime üleöö 1,5 ml-s LB vedelsöötmes selektiivse surveta (ilma Cb-ta), et rakkudest elimineerida pSW plasmiid. Plasmidi kadumist kontrollisime, plaatides rakud Cb-d sisaldavale LB söötmele ja lisaks PCR meetodil, kasutades DNA sünteesiks praimereid pSW-F ja pSW-R (tabel 2). *ligD* geeni deletsiooni PaW85 genoomis kontrollisime PCR meetodil, kasutades DNA sünteesil praimereid ligDTS1F ja ligDTS2R (tabel 2).

*Ku* geeni deleteerimiseks kasutati sama strateegiat, mida *ligD* deleteerimiseks. KuTS1 fragment amplifitseeriti praimeritega PpKuTS1F ja PpKuTS1R ning kuTS2 fragment praimeritega PpKuTS2F ja PpKuTS2R (tabel 2). Peale SOE-PCR läbiviimist kloneeriti KuTS1TS2 fragment plasmidi pJP5603 ja saadud plasmiid nimetati pJPkuTS1TS2. *Ku* geeni deletsiooni PaW85 genoomis kontrolliti PCR meetodil, kasutades DNA sünteesil praimereid PpKuTS1F ja PpKuTS2R (tabel 2).



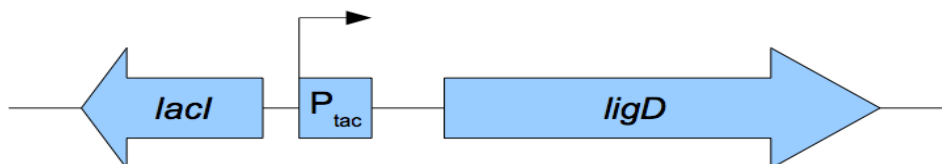
Joonis 5. Geenide *ligD* ja *ku* deleteerimisel kasutatud strateegia. 1. TS1 ja TS2 fragmentide amplifitseerimine. 2. SOE-PCR fragmentide TS1 ja TS2 ühendamiseks. TS1R praimer 5' otsas olev järjestus on komplementaarne praimer TS2F järjestusega. 3. Saadud TS1TS2 fragmendi ja plasmidi restriksioon ja klonimine plasmidi pJP5603. 4. *P. putida* rakkudes viidud plasmidi inserteerumine kromosoomi. 5. pSW plasmiidilt ekspresseeritud I-SceI nukleas lõikab kromosoomist plasmidi välja. 6. Tekkinud kaheaahelaline katke parandatakse homoloogilise rekombinatsiooni teel, mille tulemusel deleteeritakse geen kromosoomist (A) või taastatakse algne järjestus (B).



### 2.2.3 LigD üleekspressiooniga *P. putida* tüve konstrueerimine

Selleks, et konstrueerida *lacI-P<sub>tac</sub>ligD* geenikasseti sisaldavad *P. putida* tüved, amplifitseerisime PCR meetodil *P. putida* tüvest PaW85 ligD geeni, kasutades selleks primereid ligDHindIII ja ligD2HindIII (tabel 2). Saadud DNA fragmenti lõikasime restriктаasidega HindIII ja VspI ning kloneerisime restriктаasiga HindIII avatud vektorisse pBAMlacItac. Saadud plasmidi nimetasime pBAMlacItacIigD. Selle plasmidi abil on võimalik kanda *lacI-P<sub>tac</sub>ligD* geenikasseti (joonis 4) sisaldav mini-Tn5 bakterite konjugatsiooni teel *P. putida* rakkudesse, kus transposoon inserteerub kromosoomi. Kuna pBAM1 pole võimeline *P. putida* rakkudes replitseeruma, said selektiivsöötmel kasvama hakata ainult transkonjugandid, milles minitransposoon oli inserteerunud bakteri kromosoomi. Transposoon miniTn5 inserteerub *P. putida* kromosoomi juhuslikult. Transkonjugante selekteerisime minimaalsöötmel, mis sisaldas süsinikuallikana glükoosi ja transposooni insertiooniselektiooniks kanamütsiini. Lisaks kontrollisime *lacI-P<sub>tac</sub>ligD* geenikasseti olemasolu *P. putida* kromosoomis PCR meetodil, kasutades DNA sünteesil primereid pRtac, lacIOc1 ja ligDalt600 (tabel 2).

Geenilt transkriptsiooni initsieerimiseks on vajalik isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiidi (IPTG) lisamine söötmesse. IPTG seondub LacI repressoriga, takistades LacI seondumist promootoralaga ning see võimaldab transkriptsiooni P<sub>tac</sub> promootorilt.



Joonis 4. *lacI-P<sub>tac</sub>ligD* geenikasseti graafiline kujutis. *ligD* geen on viidud *P<sub>tac</sub>* promootori kontrolli alla, millelt lähtuvat transkriptsiooni reguleerib negatiivselt LacI.

### 2.2.4 PCR

PCR-i reaktsiooni maht oli 20 µl. Reaktsioonisegu sisaldas: PCR-i puhvrit (10 kordse puhvri koostis oli: 75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Triton X 100; 0,5% Ficoll 40; 1 mM tartrasiin), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP-d, 10 pmol primereid, 0,5 u prof.

Juhan Sedmani laboris puhastatud Taq polümeraasi või Pfu polümeraasi (Thermo Scientific\* Fermentas), ~10 ng isoleeritud DNA-d või rakke ning autoklaavitud monodestilleeritud vett lõppmahuni 20 µl. PCR-i teostasime firma „Biometra“ ja „Eppendorf“ PCR-i masinatega tingimustes: denaturatsioon temperatuuril 96°C 30 sekundit, praimeride seondumine temperatuuril 54°C - 64°C 30 sekundit, DNA süntees toimus temperatuuril 72°C 30 sekundit kuni 3 minutit sõltuvalt amplifitseeritava ala pikkusest. Reaktsiooni korralti 25-30 tsüklit.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid.

Nimi	Järjestus	Seondumiskoht
ligDalt600	5'-GCGAAACAGGTTCCACACG-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni alaga positsioonides 426 kuni 407 nukleotiidi allapoole translatsiooni startkoodonist ATG
ligDEcoRI	5'-ATATGAATTCGGCGTGAGGAACTGGCGC-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni alaga positsioonides 2344 kuni 2362 nukleotiidi allapoole translatsiooni startkoodonist ATG
ligD1	5'-GCCTGAAGGCGACGCGCATG-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni positsioonidega 336 kuni 355
ligD2	5'-GCTCAAGCAGTTGGCGCAAT-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni positsioonidega 1039 kuni 1020
ligD3	5'-CGACAGCTACCGCTGCAGAAC-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni positsioonidega 988 kuni 1008
ligD4	5'-GACTTCGCGCTTGGTCACAC-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni positsioonidega 1698 kuni 1679
ligD5	5'-GTGAACTGCGGCTGACCCAC-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni positsioonidega 1631 kuni 1650
ligDTS1F	5'-ATATGAATTC TCGTCAATCACTTCATCGGTC-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -572 kuni -552 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geeni poole
ligDTS1R	5'-TCCAATCGCAGGGGCATCACAGATCAAGGTCTCTAAGGTG-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -14 kuni -34 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geenist eemale (5' ots komplementaarne ligDTS2F praimeriga)

ligDTS2F	5'-TGATGCCCCTGCGATTGGA-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni taha jääva alaga positsioonides 2503 kuni 2520 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geenist eemale
ligDTS2R	5'-ATATGGATCCGTATCGTTGAA CGCCACCTC-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni taha jääva alaga positsioonides 3104 kuni 3085 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geeni poole
ligDHindIII	5'- ATATAAGCTTGAGTGTATGGCTTAG GTGC-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -161 kuni -143 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geeni poole
ligD2HindIII	5'-ATATAAGCTTGCAACGGTAGCA GGTCGAG-3'	komplementaarne <i>ligD</i> geeni taha jääva alaga positsioonides 2690 kuni 2671 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geeni poole
PpKuTS1F	5'-ATATGAATTCGAGGTGAACACC GTGTTAC-3'	komplementaarne <i>ku</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -582 kuni -563 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geeni poole
PpKuTS1R	5'-CTCAATGGCATTGGCCGTGCAG GGTTCCTGCTGATAC-3'	komplementaarne <i>ku</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -12 kuni -30 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geenist eemale
PpKuTS2F	5'-CACGGCCAATGCCATTGAG-3'	komplementaarne <i>ku</i> geeni taha jääva alaga positsioonides 824 kuni 842 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geenist eemale
PpKuTS2R	5'-ATATGGATCCGACTGCACGTGG AAGTGCTG-3'	komplementaarne <i>ku</i> geeni taha jääva alaga positsioonides 1410 kuni 1387 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geeni poole
lacIOc1	5'-CAACGCCAATCAGCAACGA CTGTT-3'	praimer seondub plasmiidis pBAMlacItac sisalduva <i>lacI</i> järjestusega, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole

prtac	5'-AATTAATCATCGGCTCGTATAA-3'	praimer seondub plasmiidis pBAMlacItac sisalduva P <sub>tac</sub> promootori järjestusega, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
recAalg	5'-ATGGACGACAACAAGAAGCGC GCC-3'	komplementaarne <i>recA</i> geeni positsioonidega 1 kuni 24
tet_ots2	5'-GGAATGGACGATATCCCCGC-3'	komplementaarne tetratsükliini resistentsusgeeni positsioonidega 114 kuni 96, suunaga ATG initsiaatorkoodoni poole
rpoSBamHI	5'-ATTGGATCCATGGCTCTCAGTAA AGAAGT-3'	komplementaarne rpoS geeni positsioonidega 1 kuni 20
KmOc	5'-TCGAGCAAGACGTTTCCC-3'	komplementaarne kanamütsiini resistentsusgeeni järjestusega positsioonides 34 kuni 17, suunaga ATG initsiaatorkoodoni poole
pSW-F	5'-GGACGCTTCGCTGAAAATA-3'	plasmidi olemasolu kontrollimiseks (Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011)
pSW-R	5'-AACGTCGTGACTGGGAAAAC-3'	plasmidi olemasolu kontrollimiseks (Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011)
pheABamei	5'-AAGGCGGCTCCCGTAAGACA-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -40 kuni -22 translatsiooni startkoodonist ATG
pheAtsII	5'-GTTTCATGGGGGACTGCTTC-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni alaga positsioonides 313 kuni 259 nukleotiidi translatsiooni startkoodonist ATG
ARB-PCR praimerid		
ARB6	5'-GGCACGCGTCGACTAGTACNNN NNNNNNNACGCC-3'	kõdupraimer, mille linkerregiooni järjestust ACGCC on <i>P. putida</i> kromosoomis 12050 kordust
ARB2	5'-GGCACGCGTCGACTAGTAC-3'	seondub kõdupraimeri konserveerunud 5' otsaga

BamI	5'-TTATGTAAGCAGACAGTTTT-3'	komplementaarne mini-Tn5 koosseisus oleva <i>km'</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -21 kuni -40 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geenist eemale
ME-I-uus2	5'-TATCTTGTGCAATGTAACATCA GAG-3'	komplementaarne mini-Tn5 koosseisus oleva <i>km'</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -63 kuni -87 translatsiooni startkoodonist ATG, suunaga geenist eemale

### 2.2.5 Plasmiidse DNA eraldus ja restriktioonianalüüs

Plasmiidse DNA eraldamiseks “Macherey-Nagel” Nucleospin® Plasmid Quickpure kitiga kasvasime plasmidi sisaldavaid *E. coli* rakke üleöö 5 ml-s LB-söötmes plasmidi selektsiooniks vajaliku antibiootikumi juuresolekul. DNA eraldasime rakkudest vastavalt tootja poolt koostatud protokollile.

DNA restriktsiooniks kasutasime firma „Fermentas“ ensüüme. Reaktsioonid viisime läbi tingimustel, mis olid ette antud firma poolt koostatud ensüümide kataloogis.

### 2.2.6 Geelelektroforees ja PCR produktide puhastamine geelist

Geelektroforeesi kasutasime PCR produktide, DNA eralduse ja restriktiooni analüüsimiseks. Geelelektroforeesiks lisasime DNA proovile 0,04%-list broomfenoolsinise lahust 50%-ses glütseroolis, 20 µl proovi kohta 4 µl. Proovid kandsime horisontaalsele 1% agarosgeelile TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA; pH 8,2). Geel sisaldas etiidiumbromiidi 0,1 µg/ml. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutasime firma „Fermentas“ DNA suurusmarkerit ZipRuler Express DNA Ladder. Elektroforeesi viisime läbi toatemperatuuril, pingel 12 – 13 V/cm. Geeli pildistasime ultravioletvalguses.

Vajadusel puhastasime PCR produktid geelist “Macherey-Nagel” NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kitiga vastavalt tootja poolt koostatud protokollile.

## 2.2.7 Bakterite elektroporatsioon

*E. coli* rakkude elektroporatsioonil kasutasime Sharma ja Schimke (1996) meetodit. Üleöö LB-vedelsöötmes kasvanud *E. coli* tüvesid DH5 $\alpha$ , DH5 $\alpha$ pir ja CC118 $\lambda$ pir lahjendasime 5 ml LB-vedelsöötmesse optilise tiheduseni A580 = 0,1 ja lasime kasvada temperatuuril 37°C loksutil ligikaudu 1,5-2 tundi, et kultuur jõuaks eksponentsiaalsesse kasvufaasi. Rakud tsentrifuugisime söötimest välja maksimumpööretel (12000 x g) 30 sekundi jooksul firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugiga „Mini Spin“ ja eemaldasime supernatandi. Seejärel pesime *E. coli* rakke kolm korda 1 ml 10%-lise glütserooliga ning suspendeerisime rakud 50  $\mu$ l 10%-lises glütseroolis.

*P. putida* rakkude elektroporatsioonil kasutasime Choi jt. (2006) meetodit. Lasime rakkudel kasvada üleöö 1,5 ml LB-vedelsöötmes. Üleöö kasvanud rakud tsentrifuugisime söötimest välja (12 000 x g) 30 sekundi jooksul lauatsentrifuugiga „Mini Spin“ ja eemaldasime supernatandi. Seejärel pesime *P. putida* rakke kolm korda 1 ml 300 mM sahharoosi lahusega ning suspendeerisime rakud 100  $\mu$ l 100 mM sahharoosi lahuses.

Elektroporatsiooniks lisasime nii *E. coli* kui ka *P. putida* rakkudele ligikaudu 100 ng vees lahustunud plasmiidset DNA-d ja pipeteerisime rakud eelnevalt jääl jahutatud elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsiooni teostasime firma „BioRad“ elektroporaatoriga „*E. coli* Pulser“ pingel 2500 V. Pärast elektroporatsiooni lisasime rakkudele 1,5 ml LB-söödet ja lasime kasvada ligikaudu tund aega termostaadis, *E. coli* rakke temperatuuril 37°C ja *P. putida* rakke temperatuuril 30°C. Siis tsentrifuugisime rakud söötimest välja, eemaldasime söötme nii, et alles jäi ligikaudu 100  $\mu$ l LB-söödet, milles suspendeerisime rakud ning plaatisime selektiivtassile.

## 2.2.8 Bakterite konjugatsioon

Homoloogilise rekombinatsiooni läbiviimiseks *recA* ja *rpoS* algsete geenide ja katkestatud geenide vahel, geenide *ku* ja *ligD* deleteerimiseks ja ka ekspressioonikasseti (plasmiidis pBAMlacItac asuva minitransposooni abil) viimiseks PaW85 kromosoomi kasutasime bakterite konjugatsiooni. Selleks kasvasime üleöö *E. coli* tüvesid CC118 $\lambda$ pir või DH5 $\alpha$ pir, mis sisaldasid ülekantavat plasmidi, retsipienttüve ja plasmiidide ülekandeks vajalikku helperplasmidi RK2013 sisaldavat *E. coli* tüve HB101. Edasi lahjendasime üleöö LB-vedelsöötmes plasmiidide selektsiooniks vajalike antibiootikumide juuresolekul kasvanud

kultuure tiheduseni  $A_{580} = 0,1$  värskesse LB-söötmesse, kuhu antibiootikume ei lisanud ja kasvatasime loksutil ligikaudu 2-3 tundi. Konjugatsiooniks segasime kokku võrdse koguse (100 µl) doonor-, retsipient- ja helpertüve kultuuri ja pipeteerisime 100 µl rakkude segu LB-tassile ning kasvatasime konjugatsiooni toimumiseks üleöö 30°C juures. Seejärel suspendeerisime rakukultuuri 1 ml 1 x M9 lahuses ja plaatisime sellest 100-150 µl kogused minimaalselektiivtassile, millel said kasvada ainult transkonjugandid.

### 2.2.9 DNA sekveneerimine „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ reaktiividega

Selleks, et kontrollida konstruktide ja bakteritüvede õigsust ja teha kindlaks *P. putida* rakkudes fenooli kasutuselevõtmist tagavad mutatsioonid *pheA* geenis testsüsteemi pKTpheA22TAG puhul, sekveneerisime vastavad DNA piirkonnad. Esmalt amplifitseerisime meid huvitavad DNA piirkonnad PCR meetodil. LigD geeni amplifitseerimiseks kasutasime praimereid ligD2HindIII ja ligDHindIII; ligDTS1TS2 fragmendi amplifitseerimiseks kasutasime praimereid ligDTS1F ja ligDTS2R; kuTS1TS2 fragmendi amplifitseerimiseks kasutasime praimereid PpkuDTS1F ja PpkuTS2R; testsüsteemi pKTpheA22TAG puhul kasutasime amplifitseerimiseks praimereid PheAtsII ja PheBamei (Tabel 2).

Enne sekveneerimisreaktsiooni töötlesime PCR-i produkte aluselise fosfataasiga (SAP; 1 U/ µl) ja eksonukleas I-ga (ExoI; 2,5 U/µl), et eemaldada kasutamata jäänud PCR-i praimerid ja desoksüribonukleotiidid. Reaktsioon toimus temperatuuril 37°C 30 minutit ning ensüümide inaktivatsioon temperatuuril 80°C 15 minuti jooksul.

Sekveneerimiseks vajalikud proovid valmistasime „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“-i reaktiividega. Segu lõppmaht oli 10 µl. DNA sekveneerimiseks võtsime 1 µl PCR-i produkti (5-20 ng DNA-d), 0,7 µl BigDye premixi, 2 µl 5x lahjenduspuhvit, 1,6 pmol praimerit, 5,4 µl dH<sub>2</sub>O. *LigD* geeni sekveneerimisel kasutasime praimereid ligD1, ligD2, ligD3, ligD4, ligD5, ligDHindIII, ligDalt600 ja ligDEcoRI; ligDTS1TS2 fragmendi sekveneerimiseks kasutasime praimereid ligDTS1F ja ligDTS2R; kuTS1TS2 fragmendi sekveneerimiseks kasutasime praimereid PpkuTS1F ja PpkuTS2R; testsüsteemi pKTpheA22TAG puhul kasutasime sekveneerimiseks praimerit PheBamei (Tabel 2). Reaktsioon toimus järgmistel tingimustel: DNA denaturatsioon temperatuuril 95°C 15 sekundit, praimerit seondumine temperatuuril 50°C juures sekundit, DNA süntees temperatuuril 60°C 45 sekundit, kokku 30 tsüklit. Saadud PCR-i produktile lisasime 2 µl

dekstraanilahust ja 30 µl 96° etanooli, segasime ja sadestasime -20°C juures 15 minutit. Seejärel tsentrifuugisime firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugiga 15 minutit täispööretel (12 000 x g), eemaldasime supernatandi ja pesime DNA sadet 100 µl 75° etanooliga kaks korda, tsentrifuugides 5 minutit täispööretel (12 000 x g). Sademe lahustasime 10 µl 70% formamiidis. Sekveneeritud järjestuste võrdlemiseks kasutasime programmi „BioEdit“.

## 2.2.10 ARB-PCR ja DNA sekveneerimine

Minitransposooni koostises oleva *lacI-P<sub>tacligD</sub>* geenikasseti lokaliseerimise kindlakstegemiseks PaW85 kromosoomis amplifitseerisime PCR-i abil kromosoomist piirkonna, mis sisaldas inserteerunud DNA-d ja sellele külgneva ala liitjärjestust ja seejärel sekveneerisime seda.

Selleks, et saada teada *lacI-P<sub>tacligD</sub>* geenikasseti lokaliseerimine *P. putida* kromosoomis, pidime esmalt amplifitseerima transposoon miniTn5 insertioonikohaga külgneva kromosoomi järjestuse ARB-PCR teel. ARB-PCR koosneb kahest etapist. Esimeses etapis tekkivate juhusliku pikkusega DNA fragmentide saamiseks kasutasime praimerit BamI ja koodupraimerit Arb6 (tabel 2). Koodupraimeri 3' otsas asub 5 – 6 nukleotiidi pikkune linkerregioon, mis on valitud *P. putida* kromosoomiga seondumise sageduse alusel, olles kõikidel koodupraimeritel erinev, järgnev 10 nukleotiidi pikkune regioon sisaldab juhuslikus järjekorras kõiki nelja nukleotiidi ning koodupraimerite 5' ots on konserveerunud, sisaldades järjestust, millega ARB-PCR-i teises etapis seondub praimer ARB2. ARB-PCR toimus järgmistes tingimustes: DNA denaturatsioon 96°C 30 sekundit, praimer seondumine temperatuuril 30°C 30 sekundit, DNA süntees temperatuuril 72°C 1,5 minutit, kokku 6 tsüklit, sellele järgnes 30 tsüklit, kus DNA denaturatsioon toimus temperatuuril 96°C 30 sekundit, praimer seondumine temperatuuril 45°C 30 sekundit, DNA süntees temperatuuril 72°C 1,5 minutit.

ARB-PCR-i teise etapi läbiviimiseks võtsime 0,4 µl esimeses etapis saadud PCR-i produkti, mida amplifitseerisime kasutades primereid ARB2 ja ME-I-uus2 (tabel 2). Teine reaktsioon toimus järgmistes tingimustes: DNA denaturatsioon 96°C 30 sekundit, praimer seondumine temperatuuril 59°C 30 sekundit, DNA süntees temperatuuril 72°C 1,5 minutit, kokku 30 tsüklit.

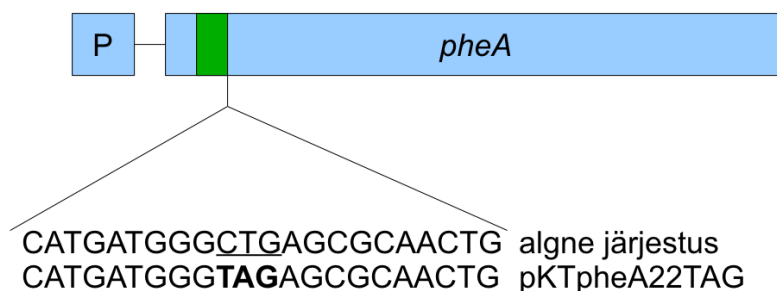
Järgnevalt sekveneerisime ARB-PCR-i teises etapis saadudprodukte vastavalt eelmises peatükis kirjeldatud protokollile. DNA sekveneerimisse võtsime 0,5 µl ARB-PCR-i produkti



ja kasutasime sekveneerimisel praimerit ME-I-uus2 (1,6 pmol).

### 2.2.11 Mutatsioonide tekkesageduse määramine nälgivates *P. putida* rakkudes

*P. putida* nälgivas populatsioonis toimuvate mutatsiooniprotsesside uurimiseks kasutasime fenooli monooksügenaasi geeni *pheA* funktsionaalsuse taastamisel põhinevat testsüsteemi pKTpheA22TAG (Tegova jt., 2004). See on asendusmutatsioonide detekteerimiseks konstrueeritud testsüsteem, mis on konstrueeritud plasmidi pKT240 põhjal, kuhu on sisse viidud modifitseeritud *pheA* geen. *pheA* geenis on algse järjestuse 22. positsioonis olev leutsiini kodeeriv CTG koodon asendatud translatsiooni stopp-koodoniga TAG (Joonis 6) ja rakud ei saa kasutada C-allikana fenooli. Rakud saavad hakata tarvitama fenooli juhul, kui *pheA* geeni järjestuses toimub asendusmutatsioon, mis muudab TAG stopp-koodoni mõnda aminohapet kodeerivaks koodoniks. Selles positsioonis võivad olla erinevad aminohapped, ilma et see mõjutaks fenooli monooksügenaasi aktiivsust (Tegova jt., 2004).



Joonis 6. Asendusmutatsioonide tuvastamiseks konstrueeritud testsüsteem. Joonisel on näidatud *pheA* algne järjestus ja selle mutantne variant. Asendusmutatsioonide isoleerimiseks konstrueeritud testsüsteemis asendati CTG (algsel järjestusel alla joonitud) stopp-koodoniga TAG (märgitud tumedalt). Transkriptsioon *pheA* geenilt on initsieeritud konstitutiivselt promootorilt (tähistatud P-ga). Joonise tegemisel on aluseks võetud Tegova jt., 2004 ilmunud artiklis esitatud joonis.

*P. putida* rakke, mis sisaldasid pKTpheA22TAG plasmidi, kasvasime 2,3 ml-s glükoos-minimaalsöötmes hilise logaritmilise kasvufaasini (~6 tundi). Seejärel tegime rakukultuurist  $10^5$  kordse lahjenduse ning kasvasime paraleelkultuure (5-10) katseklaasides 18-20 tundi temperatuuril 30°C 2,3 ml-s süsinikuallikana glükoosi sisaldavas

minimaalsöötmes, mis plasmidi selektsiooniks sisaldas Cb-i. Järgmisel päeval plaatisime 250 µl või 500 µl rakukultuuri fenool-Cb-minimaaltassidele ja *lacI-P<sub>tacligD</sub>* geenikassetti sisaldavate tüvede puhul lisasime ka IPTG lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM. Phe<sup>+</sup> revertantide akumulereumist selektiivtassidel jälgisime 10 päeva jooksul peale plaatimist. Phe<sup>+</sup> revertantide tekkesageduse arvutasime nälgivas populatsioonis olevate elusrakkude kohta.

Bakterirakkude elumust määrasime kogu nälgimisperioodi jooksul kolooniaid moodustavate rakkude (CFU – *Colony Forming Units*) arvukuse alusel samadelt fenooli minimaaltassidelt, millel jälgisime Phe<sup>+</sup> revertantide teket. 1 ml pipetiotsikut kasutades lõikasime tassidelt agaritükikesed, vältides Phe<sup>+</sup> kolooniaid. Rakud suspendeerisime agarilt 1-kordses M9 lahuses loksutades. Seejärel tegime vastavad lahjendused ja pipeteerisime igast lahjendusest 10 µl LB tassidele. Elusrakkude arvu määrasime vähemalt kahest sõltumatust bakterikultuurist. Lähtudes tassidele tekkinud rakkude arvust ja tehtud lahjendusest arvutasime agaritükil olevate elusrakkude arvu. Seejärel tuletasime tassi ja agariketta pindala suhte alusel kogu elusrakkude arvu Phe-Cb tassidel. Agariketta pindala moodustab 1/100 kogu tassi pindalast.

## **2.2.12 Mutatsioonisageduste võrdlus ANOVA statistilise analüüsi meetodi ja „Tukey“ testi abil**

Statistiliselt oluliste erinevuste detekteerimiseks mutatsioonisageduste vahel kasutasime ANOVA statistilise analüüsi meetodit ja „Tukey HSD“ testi. P-väärtus < 0,05 tähendab et võrreldavate tüvede mutatsioonisagedused on üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad. Eelnevalt oli vaja andmed viia normaaljaotusesse. „Shapiro-Wilk“-si testi (testib null hüpoteesi, et valim pärineb normaaljaotusega populatsioonist) (Shapiro ja Wilk, 1965) kasutasime, et vaadata kui sarnased on meie andmed normaaljaotusele. „Shapiro-Wilk“-si testi statistikuks on W ja mida lähemal on W väärtus ühele, seda paremini vastavad andmed normaaljaotusele (kui W väärtus läheneb nullile, siis seda vähem vastavad andmed normaaljaotusele). Selleks, et viia andmed normaaljaotusesse, logaritmisime need (vältimaks logaritmi võtmist nullist, liitsime kõigile andmetele enne logaritmimeist juurde 1). Statistilist analüüsi aitas läbi viia Riho Teras.

### 2.2.13 Mutatsioonispektri analüüs kasutades Monte Carlo meetodit ja hii-ruut testi

Statistiliselt oluliste erinevuste detekteerimiseks pKTpheA22TAG testsüsteemis *P. putida* tüvede mutatsioonispektrite vahel kasutasime Monte Carlo meetodit, mis põhineb hüpergeomeetrilise testi algoritmidel (Adams ja Skopek, 1987; Piegorsch ja Bailer, 1994). Tarkvara testi (Cariello jt., 1994) tegemiseks on kättesaadaval veebiaadressil [http://www.ibiblio.org/dnam/des\\_hypg.htm](http://www.ibiblio.org/dnam/des_hypg.htm). *P*-väärtused on leitud 30 000 iteratsiooni (*iteration*) põhjal. *P*-väärtus < 0,05 viitab sellele, et paariviisilisel võrdlemisel on spektrid üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad, kuid kuna me võrdlesime 8 - st erinevast tüvest pärit mutatsioonispektrit ja viisime läbi mitmeid paariviisilisi võrdlusi, siis tuleks rakendada Bonferroni korrigeerimise testi ja seega on korrigeeritud olulisuse nivoo meie andmete jaoks 0,001786, mida saab arvutada valemi abil  $0,05 / \frac{(n-1) \times n}{2}$ , kus *n* on võrreldavate mutatsioonispektrite koguarv. Statistilist analüüsi aitas läbi viia Riho Teras.

Hii-ruut testi teostasime programmi „Statgraphics“ abil. Hii-ruut testi abil on võimalik võrrelda gruppide proportsioone.

### 2.2.14 Eksponentsiaalselt kasvavates *P. putida* kultuurides rifampitsiin-resistentsete mutantide tekkesageduse määramine

Spontaansete mutatsioonide tekkesageduse *P. putida* kasvavates rakkudes arvutasime Rif resistensete mutantide tekkesageduse järgi. Selleks kasvasime uuritava *P. putida* tüve rakke M9 glükoos-minimaalsöötmes hilise logaritmilise kasvufaasini (~6 tundi loksutil). Seejärel tegime  $10^5$  kordse lahjenduse värskesse M9 glükoos-minimaalsöötmesse, *lacI*-*P<sub>tacligD</sub>* geenikasseti sisaldavate tüvede puhul lisasime ka IPTG lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM, jagasime kultuuri 2,3 ml kaupa katseklaasidesse (10 - 20) ja lasime temperatuuril 30°C kasvada 18-20 tundi. Järgnevalt plaatisime 500 µl igast kultuurist 100 µg/ml Rif sisaldavatele LB tardsöötmetele ja inkubeerisime temperatuuril 30°C. 24 ja 48 tunni pärast loendasime tekkinud Rif<sup>r</sup> kolooniad ja summeerisime.

Selleks, et määrata Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesagedust, on vajalik teada kogu bakteripopulatsiooni rakkude arvukust. Selleks tegime 18-20 tundi kasvanud kultuurist  $10^{-4}$ -

$10^{-7}$  lahjendused ja pipeteerisime igast lahjendusest 10 µl LB tassile. Lähtudes lahjendusest ja tekkinud kolooniate arvust leidsime elusrakkude arvu. Elusrakkude arvu määrasime vähemalt kahest sõltumatust bakterikultuurist. Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesageduse leidmiseks jagasime Rif<sup>r</sup> kolooniate arvu elusrakkude arvuga. Üldise mutatsioonide tekkesageduse arvutamiseks kasutasime mediaanarvutust.

### **2.2.15 Statsionaarses faasis *P. putida* kultuurides rifampitsiin-resistentsete mutantide tekkesageduse määramine**

Spontaansete mutatsioonide tekkesagedust *P. putida* statsionaarse faasi rakkudes arvutasime Rif resistensete mutantide tekkesageduse järgi. Selleks kasvasime *P. putida* tüve rakke üleöö 1,5 ml-s LB söötmes, tegime vastavad lahjendused ning plaatisime M9-CAA-glükoosi tassidele ligikaudu 100 rakku. Tasse inkubeerisime 10 päeva temperatuuril 30°C. Seejärel kraapisime külvitikuga tassilt ükshaaval eraldi paiknevad kolooniad, suspendeerisime iga koloonia 1,5 ml-s M9-CAA söötmes ning lasime kasvada loksutil 1-1,5 tundi temperatuuril 30°C. Järgnevalt tsentrifuugisime kogu rakukultuuri põhja, valasime söötme pealt ära, jättes alles ligikaudu 100 µl, suspendeerisime selles rakud ja plaatisime 100 µg/ml Rif sisaldavatele LB tardsöötmetele ja inkubeerisime temperatuuril 30°C. Kokku analüüsisime igast tüvest kõigis läbiviidud katsetes 14 kuni 15 kolooniat. 24 ja 48 tunni pärast loendasime tekkinud Rif<sup>r</sup> kolooniad.

Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesageduse leidsime vastavalt eelmises peatükis kirjeldatule (vaata teine lõik).

### **2.2.16 *P. putida* tüvede kemikaalide tundlikkuse testimine**

Testisime *P. putida* tüvede tundlikkust järgnevate kemikaalide suhtes: mitomütsiin C (0,5-2 µg/ml); ciprofloksatsiin (0,001 µg/ml – 0,05 µg/ml); nitrokinoliin (5 mM – 300 mM). Kemikaalide tundlikkuse testimiseks ekponentsiaalselt kasvavate rakkude puhul tegime 1,5 ml-s LB-s üleöö kasvanud *P. putida* kultuurist lahjenduse 5 ml-sse LB söötmesse ja lasime rakkudel kasvada 2 tundi, seejärel tegime kultuuridest  $10^{-3}$ - $10^{-7}$  lahjendused ja pipeteerisime igast lahjendusest kemikaale sisaldavatele LB tassidele 5 µl. Statsionaarse faasi rakkude tundlikkuse määramiseks kasvasime *P. putida* rakke 5 ml-s LB söötmes üleöö, seejärel tegime kultuuridest  $10^{-3}$ - $10^{-7}$  lahjendused ja pipeteerisime igast lahjendusest kemikaale sisaldavatele LB agarplaatidele 5 µl kultuure. Samad lahjendused plaatisime ka LB agarile,

kuhu ei olnud kemikaale lisatud. Seejärel inkubeerisime külve 24 või 48 tundi temperatuuril 30°C.

## 2.3 Tulemused

Ku ja LigD valgud, mis viivad läbi NHEJ-d, on olemas paljudes bakterites, sealhulgas ka *P. putida*'s. Arvatakse, et Ku ja LigD peamisteks ülesanneteks on lineariseeritud plasmidi retsirkulariseerimine rakkudes ning DSB-de parandamine statsionaarses faasis. Lisaks näitavad nii biokeemilised kui *in vivo* katsed, et DSB-de parandamine on mutageenne. Mutatsioonide tekkega on seotud LigD, millel on ka DNA polümeraasne aktiivsus (Gong jt., 2005; Yakovleva ja Shuman, 2006; Aniukwu jt., 2007; Malyarchuk jt., 2007), mis omakorda tekitab küsimuse, kas LigD võiks osaleda statsionaarse faasi mutageneesil. Tarassova jt. (2009) näitasid meie töögrupis, et RpoS puudumisel *P. putida* rakkudes esinevad pKTPheA22TAG testsüsteemi kasutades mutatsioonispektris deletsioonid, mida varem selle testsüsteemi puhul pole täheldatud. *P. putida*'s on statsionaarse faasi mutageneesiga seotud DNAP Pol IV (DinB), mis vastutab 1-bp raaminihke mutatsioonide eest (Tegova jt., 2004). Seega tekkis küsimus, mis mehhanismid ja ensüümid on seotud suuremate deletsioonide tekkega statsionaarse faasi rakkudes. Samuti tekkis küsimus, kas LigD võiks osaleda statsionaarse faasi mutageneesil lisaks deletsioonide tekitamisele ka teiste mutatsioonide tekkel. Minu ülesandeks sai konstrueerida lisaks laboris varem konstrueeritud NHEJ valkude defektsetele tüvedele LigD üleekspressioonitüvi ja LigD deletsioonitüvi ning uurida, kas LigD võiks osaleda mutatsioonide tekkes ka NHEJ rajast sõltumatult.

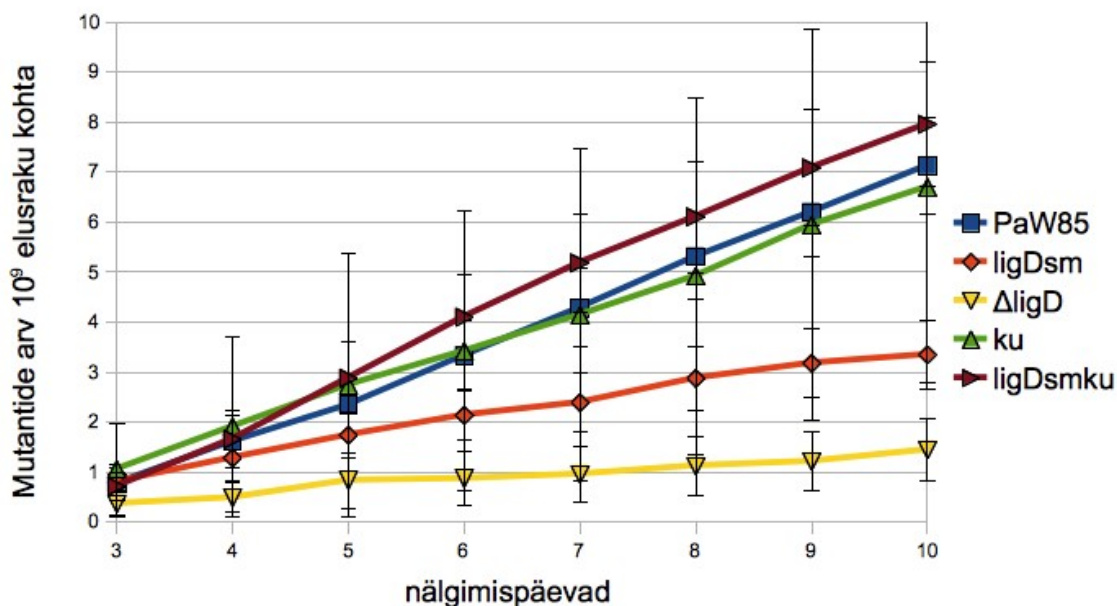
### 2.3.1 LigD ja Ku osalus *P. putida* statsionaarse faasi mutageneesil

Seni ei ole NHEJ ensüümide osalust statsionaarse faasi mutageneesil uuritud. Selleks, et selgitada, kas LigD ja Ku mõlemad võiksid osaleda statsionaarse faasi mutageneesil *P. putida* rakkudes, võrdlesime NHEJ-ensüümide Ku ja LigD osas defektsete tüvede mutatsioonisagedust algse tüve mutatsioonisagedusega. Laboris eelnevalt olemasolevas LigD defektses tüves ligDsm oli *ligD* geen katkestatud Sm<sup>r</sup> geeniga. Selleks, et välistada antibiootikumi resistentsusgeeni võimalikku mõju mutatsiooniprotsessidele, konstrueerisin lisaks uue tüve ΔligD, kus kogu *ligD* geen oli deleteeritud ilma antibiootikumi resistentsusgeeni viimiseta bakteri kromosoomi. Tüve konstrueerimine on kirjeldatud magistritöö "Materjal ja meetodika" osas, peatükis 2.2.2. Järgnevalt viisime läbi katsed, milles kasutasime plasmidis pKTPheA22TAG asuvat testsüsteemi. Antud testsüsteem

võimaldab detekteerida Phe<sup>+</sup> mutatsioone, mis taastavad *pheA* geeni funktsionaalsuse, kaotades *pheA* geeni viidud stopp-koodoni TAG ja tänu funktsionaalsele fenooli monooksügenaasile saavad rakud hakata kasutama fenooli süsinikuallikana (Tegova jt., 2004).

Selleks, et näha, kas mutatsioonisagedused erinevatel tüvedel on ka statistiliselt erinevad, teostasime ANOVA statistilise analüüsi, kasutades „Tukey HSD“ test (vaata „Materjal ja meetodika“ osa peatükki 2.2.12). Võrdlesime paariviisiliselt igaks katsepäevaks selektiivsöötmetele ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniate koguarvu. Kuna meie andmed ei vastanud „Shapiro-Wilk“-si testi (Shapiro ja Wilk, 1965) põhjal normaaljaotusele, siis analüüsisime „Tukey HSD“ testiga logaritmitud väärtusi (leidsime väärtustest kümnendlogaritmi). Lähtusime sellest, et kui *P*-väärtus on >0,05, siis see tähendab, et võrreldavad tüved on üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad. Nii Δ*ligD* kui ka *ligDsm* tüvel on PaW85-ga võrreldes statistiliselt oluliselt madalam selektiivsöötmele tekkinud Phe<sup>+</sup> kolooniate hulk. Δ*ligD* puhul ilmnesevad erinevused alates 5. katsepäevast ( $P = 3,1 \times 10^{-5} - 4,5 \times 10^{-2}$ ) ja *ligDsm* puhul 7. päevast ( $P = 3,1 \times 10^{-5} - 6,2 \times 10^{-3}$ ). Samas erinesid ka Δ*ligD* ja *ligDsm* omavahel alates 8. katsepäevast ( $P = 1,3 \times 10^{-3} - 1,95 \times 10^{-2}$ ). Saadud tulemuste põhjal võib oletada, et juba algse *ligDsm* tüve selektsioonil on toimunud rakkudes muutused, mis võimaldavad *LigD* puudumist vähesel määral kompenseerida (vaata arutelu). Huvitav on see, et tüvi *ligDsmku*, kus puuduvad nii *LigD* kui ka *Ku* valk, käitub sarnaselt algsele *P. putida* tüvele (statistiliselt olulist erinevust ei ilmnenu) ning mitte *ligDsm* tüvele, mis oleks olnud ootuspärane. Üks võimalik seletus nendele tulemustele võiks olla see, et mõlema NHEJ raja valgu puudumisel aktiveeritakse mõni teine reparatsioonimehhanism.

Algse tüve ja *Ku* defektse tüve puhul Phe<sup>+</sup> mutantide tekkesageduses statistiliselt olulist erinevust ei ilmnenu. Δ*LigD* tüve ja *Ku* defektse mutandi puhul erines selektiivsöötmetele ilmunud Phe<sup>+</sup> mutantide sagedus alates 7. katsepäevast ( $P = 3,1 \times 10^{-5} - 1,8 \times 10^{-2}$ ). Saadud tulemused viitavad sellele, et *LigD* osaleb statsionaarse faasi mutageneesil *Ku* valgust ja seega ka NHEJ rajast sõltumatult.

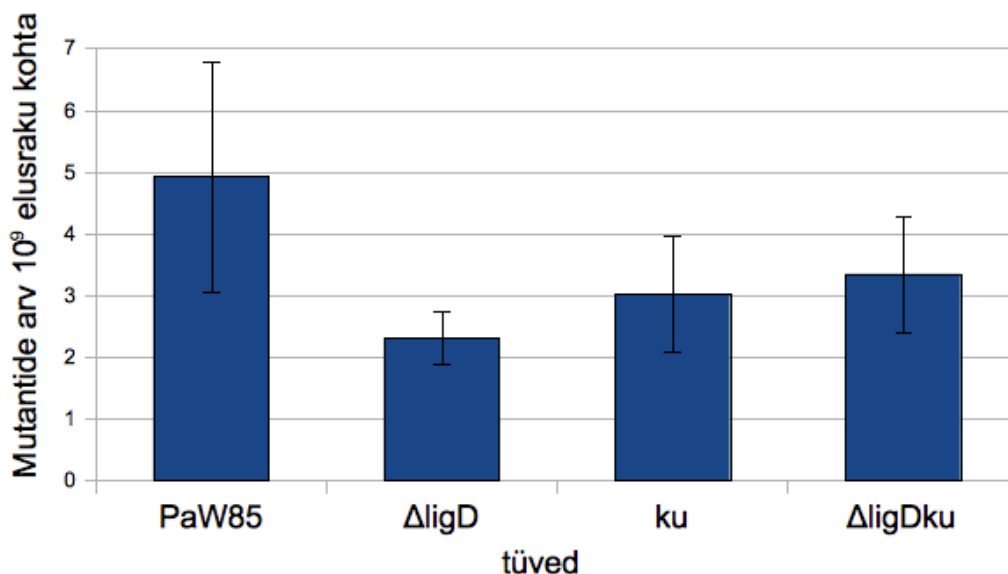


Joonis 7. Phe<sup>+</sup> kolooniate akumulatsioon fenool-minimaaltassidel NHEJ defektsetes ja algses *P. putida* tüves. Igal järgneval päeval tekkinud kolooniate arv on liidetud eelneva katseperioodi jooksul tekkinud kolooniate arvule. Nii näitab 10. päeval näha olev kolooniate arv kogu 10-päevasel katseperioodil akumulioneerunud selektiivsöötmele ilmunud kolooniate arvu. Phe<sup>+</sup> kolooniate teke on arvatud  $1 \times 10^9$  elusraku kohta. Joonisele on kantud 4.-7. sõltumatu katse tulemuste keskmised ja 95% usalduspiirid. PaW85, ku ja ligDsmku tüvede puhul on joonisele kantud laboris eelnevalt tehtud katsetest saadud tulemused (K. Mikkel, avaldamata andmed). Tüve ligDsm puhul on laboris eelnevalt tehtud 3-le katsele (K. Mikkel, avaldamata andmed) lisatud käesoleva töö raames tehtud 3 sõltumatu katse tulemused.

Lisaks plasmiidsele testsüsteemile uurisime Ku ja LigD puudumise mõju rifampitsiini (Rif) resistentsete mutatsioonide tekkesagedusele statsionaarses faasis olevates rakkudes. Rif juuresolekul on võimalik mõõta mutatsioonide teket RNA polümeraasi katalüütilist subühikut kodeerivas *rpoB* geenis (Jatsenko jt., 2010). Seega võimaldab see testsüsteem mõõta mutatsioonide tekkesagedust kromosoomis. Katse läbiviimiseks lasime bakterikultuuridel kasvada üleöö LB vedelsöötmes. Seejärel tegime kultuuridest lahjendused ning plaatisime glükoos-minimaalsöötmele sellise koguse rakke, et tassidele ei tekiks üle 100 koloonia. Lasime bakterikultuuridel kasvada 10 päeva, mis peaks kindlustama, et kõik bakterirakud on sisenenud statsionaarsesse faasi. 10. päeval tekkinud kolooniad suspendeerisime värskes



glükoos-minimaal vedelsöötmes ning lasime kasvada 1 - 1,5 tundi ning plaatisime Rif sisaldavatele tassidele. Kolooniaid lugesime kahe päeva jooksul. Toetudes varasematele andmetele meie laboris (Tarassova jt., 2009) eeldasime, et pikka aega nälginud bakterirakkudes peaks Rif resistentsete mutantide hulk algses *P. putida* tüves suurenema, kuid antud juhul me seda ei täheldanud (Joonis 8). Kuigi võrreldes algse tüvega PaW85 oli LigD-defektses tüves Rif resistentsete mutantide tekkesagedus madalam, siis statistiliselt olulisi erinevusi ei ilmnenud ei nende kahe tüve võrdluses ega ka teiste tüvede puhul ( $P = 0,0503$ ).



Joonis 8. Graafikul on esitatud Rif resistentsete mutantide hulk  $1 \times 10^9$  elusraku kohta. Igale tulpale on lisatud 95% usalduspiirid. Tulemused on saadud nelja sõltumatu katse läbiviimisel.  $\Delta$ ligD tüvel on esitatud kahe sõltumatult saadud kloonide puhul saadud tulemuste keskmine.

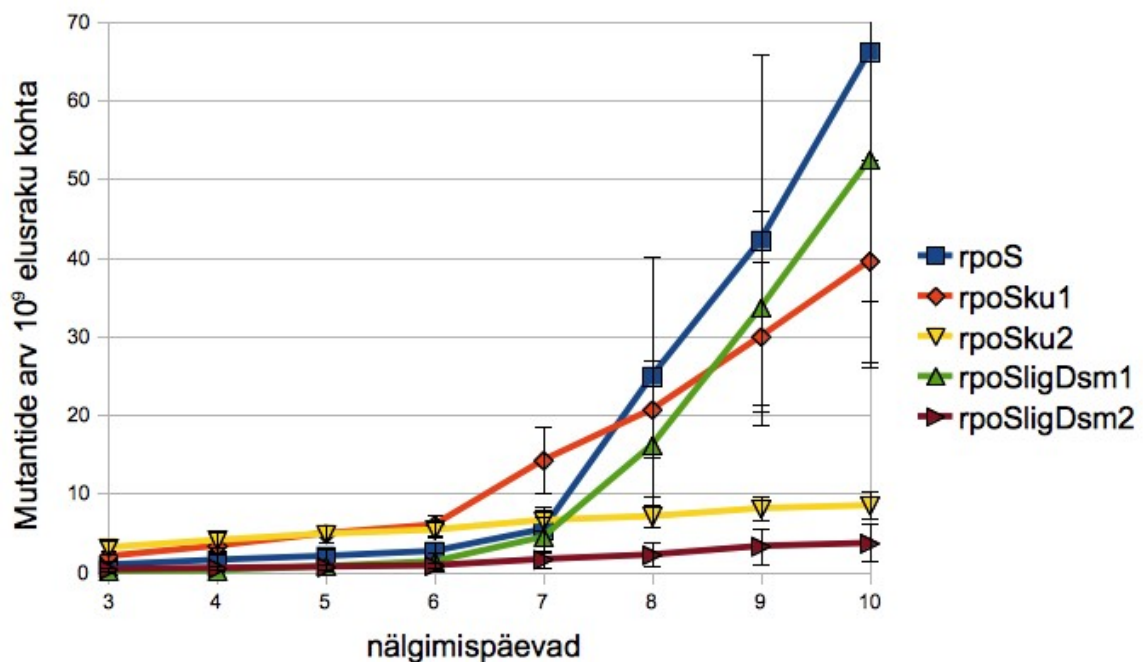
### 2.3.2 Sigma faktori RpoS mõju statsionaarse faasi mutageneesile NHEJ valkude defektsetes tüvedes

Selleks, et teada saada, kuidas mõjutab RpoS-i puudumine NHEJ defektsetes rakkudes mutatsioonide tekkimise sagedust statsionaarses faasis, võrdlesime  $\text{Phe}^+$  mutantide tekkesagedusi RpoS-defektses tüves ja topeltmutantides, kus puudus lisaks RpoS-le ka mõni NHEJ valkudest.

Ilmnes, et tüvedel rpoS $\Delta$ ligDsm ja rpoSku esineb kaks fenotüüpi, mille tähistasime 1 ja 2 (Joonis 9). RpoS puudumisel peaks  $\text{Phe}^+$  mutantide arv järsult tõusma 5. kuni 7. päevast (Tarassova jt., 2009). Osades katsetes käituvad RpoS ja NHEJ topeltmutantsed tüved rpoS

tüvele sarnaselt. Nende katsete tulemused on joonisel 9 tähistusega rpoSligDsm1 ja rpoSku1. „Tukey HSD“ test näitab, et rpoS tüve ja rpoSku tüve fenotüübi 1 Phe<sup>+</sup> mutantide tekkesagedustes on erinevused 7. ( $P = 1,9 \times 10^{-4}$ ) ja 8. ( $P = 2,5 \times 10^{-2}$ ) katsepäeval. See võib olla tingitud asjaolust, et mutatsioonide tekkesagedus ei hakka alati täpselt samal ajal suurenema. Ülejäänud katsepäevadel me nende tüvede vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei täheldanud. RpoSligDsm tüve fenotüübi 1 puhul statistiliselt olulist erinevust rpoS tüvega võrreldes ei ilmnenud. See näitab, et kuigi LigD võiks osaleda statsionaarse faasi mutageneesis, siis nende mutatsioonide puhul, mille tekkesagedus suureneb RpoS defektses tüves bakterite pikaajalisel nälgimisel, on rakkudes ka LigD-st sõltumatu mutageneesi mehhanisme.

Mõnedes katsetes tüvede rpoSligDsm ja rpoSku (joonisel tähistatud vastavalt rpoSligDsm2 ja rpoSku2) madalama mutatsioonide tekkesageduse põhjuseks võivad olla RpoS puudumist kompenseerivad mutatsioonid. Lisaks oleme mõnikord näinud ka RpoS defektsete tüvede puhul, et mutatsioonisagedus ei suurene pikaajaliselt nälgitud rakkudes. Sellised juhtumid on aga siiski pigem erandiks.



Joonis 9. Phe<sup>+</sup> kolooniate akumulatsioon fenool-minimaaltassidel RpoS ja NHEJ valkude defektsetes tüvedes ja algses *P. putida* tüves. Igal järgneval päeval tekkinud kolooniate arv on liidetud eelneva katseperioodi jooksul tekkinud kolooniate arvule. 10. päeval näha olev kolooniate hulk on kogu katseperioodil tekkinud kolooniate summa. Phe<sup>+</sup> kolooniate teke on arvutatud  $1 \times 10^9$  elusraku kohta. Joonisel on esitatud 4-5 sõltumatu katse tulemuste keskmised ja 95% usalduspiirid.

### 2.3.3 *lacI-P<sub>tac</sub>ligD* geenikasseti asukohta määramine erinevatel tüvedel

Selleks, et uurida LigD üleekspressiooni mõju statsionaarses faasis olevatele *P. putida* rakkudele, viisime tüvede  $\Delta$ ligD ja ligDsm kromosoomi *lacI-P<sub>tac</sub>ligD* geenikasseti, kus ligD geeni transkriptsioon toimub IPTG-ga indutseeritavalt  $P_{tac}$  promootorilt. Tüvede konstrueerimine on kirjeldatud magistritöö osas “Materjal ja meetodika”, peatükis 2.2.3. Geenikassett *lacI-P<sub>tac</sub>ligD* inserteerub miniTn5Km<sup>r</sup> koosseisus *P. putida* kromosoomi juhuslikult. Selleks, et määrata kindlaks, kuhu on *lacI-P<sub>tac</sub>ligD* geenikassett inserteerunud, kasutasime ARB-PCR meetodit. Saadud järjestusi võrdsime andmebaasis <http://pseudomonas.com/> oleva *P. putida* KT2440 genoomi nukleotiidses järjestusega. Geenikasseti insertioonikohad on toodud tabelis 3.

Tabel 3. *lacI-P<sub>tac</sub>ligD* geenikasseti lokalisatsioonid *P. putida* kromosoomis.

Tüvi	lookus	valk
ligDsm+D1	PP_2048	Atsüül-CoA dehüdrogenaas
ligDsm+D2	PP_5351	Glükoos-6-fosfaadi 1-dehüdrogenaas
$\Delta$ ligD+D	PP_4686	Hüpoteetiline valk

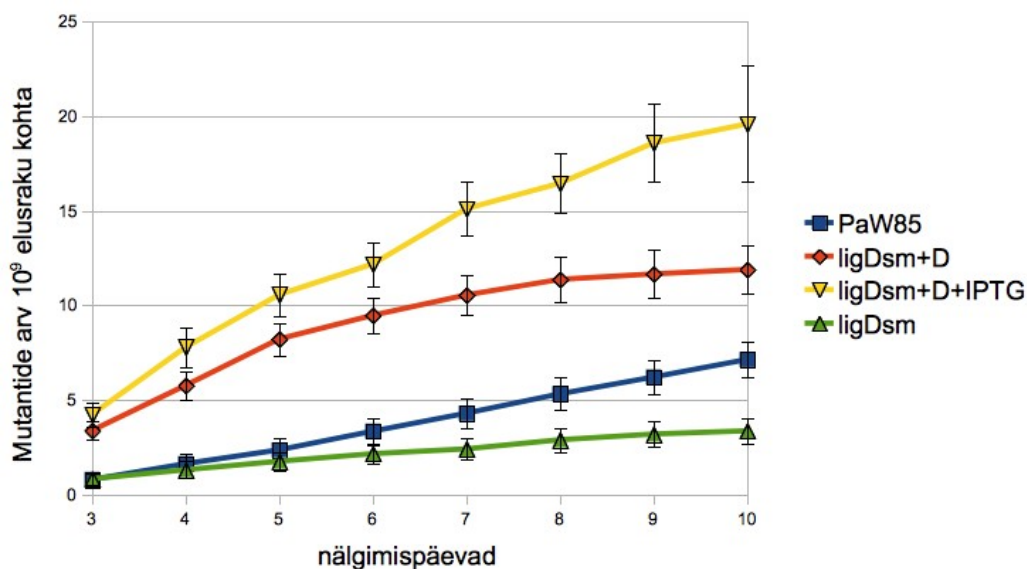
Alati on võimalus, et geenikasseti insertioon teatud lookustesse võib mõjutada mutatsioonide tekkesagedust. Antud juhul on miniTn5 inserteerunud lookustesse, mis teadaolevalt mutatsioonide tekkesagedust ei mõjuta. Tüves ligDsm+D2 on miniTn5 inserteerunud geeni, millelt kodeeritud valk osaleb pentoosfosfaadi metabolismirajas. KEGG andmebaasi andmetel (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>) on *P. putida* KT2440 genoomis veel kaks glükoos-6-fosfaadi 1-dehüdrogenaasi ortoloogi (PP\_1022 ja PP\_4042), seega ei tohiks neist ühe puudumine rakke mõjutada. Seda kinnitab ka see, et tüve ligDsm+D2 elusrakkude arv erinevates katsetes oli võrreldav *P. putida* algse tüve elusrakkude arvuga (andmeid ei ole esitatud).

### 2.3.4 LigD üleekspressiooni mõju statsionaarse faasi mutageneesile

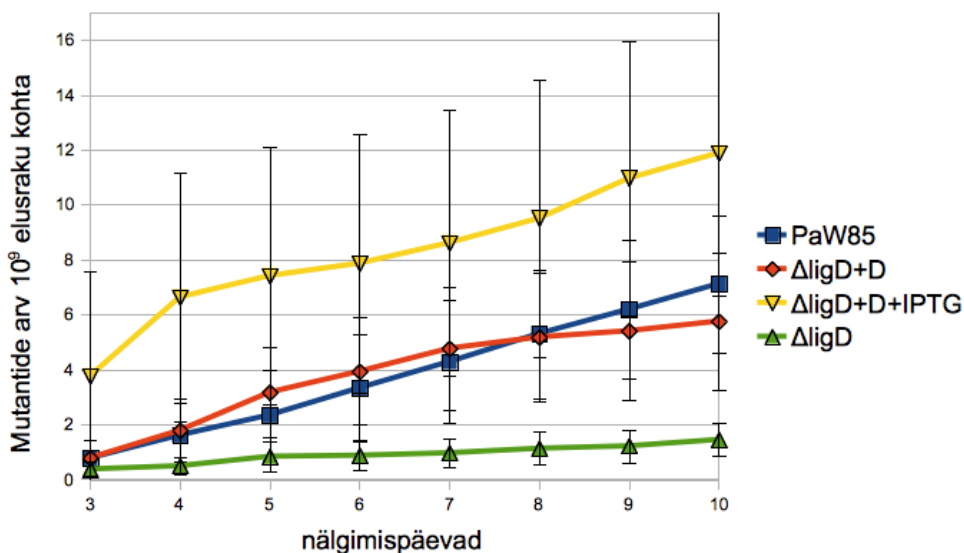
Selleks, et uurida LigD üleekspressiooni mõju mutatsioonisagedusele, viisime *lacI-P<sub>tac</sub>ligD* geenikassetti sisaldavate tüvede rakkudesse, mille nimetasime vastavalt  $\Delta$ ligD+D ja

ligDsm+D, testsüsteemi sisaldava plasmidi pKTpheA22TAG ja võrdlesime nendes tüvedes Phe<sup>+</sup> mutantide akumulatsiooniskiiirust selektiivtassidel Phe<sup>+</sup> mutantide akumulatsiooniga  $\Delta$ ligD, ligDsm ja PaW85 tüves. ligDsm+D tüve puhul viisime katsed läbi kahe sõltumatult saadud klooniga ligDsm+D1 ja ligDsm+D2 ning võtsime saadud tulemused kokku. Graafikud on esitatud joonistel 10a. ja 10b. Tüvede paariviisilisel võrdlemisel „Tukey HSD“ testi abil selgus, et ligDsm tüvi erines ligDsm+D tüvest nii IPTG juuresolekul kui ka puudumisel statistiliselt oluliselt kõigil katsepäevadel ( $P = 3,1 \times 10^{-5}$ ).  $\Delta$ ligD võrdlemisel  $\Delta$ ligD+D tüvega ilmnemise statistiliselt olulised erinevused 6. - 10. katsepäeval ( $P = 6,1 \times 10^{-3} - 2,5 \times 10^{-2}$ ).  $\Delta$ ligD võrdlemisel IPTG-ga indutseeritud  $\Delta$ ligD+D puhul ilmnemise statistiliselt olulised erinevused alates 4. katsepäevast ( $P = 3,1 \times 10^{-5}$ ). Need tulemused viitavad sellele, et LigD defektsesse tüvesse funktsionaalse *ligD* geeni viimine suurendab mutatsioonisagedust.

PaW85 ja ligDsm+D Phe<sup>+</sup> mutantide tekkesageduste vahel ilmnevad statistiliselt olulised erinevused 3. kuni 9. katsepäeval ( $P = 3,1 \times 10^{-5} - 2,3 \times 10^{-2}$ ). IPTG juuresolekul ligDsm+D tüve puhul ilmnemise statistiliselt olulised erinevused kõigil katsepäevadel võrrelduna PaW85-ga ( $P = 3,1 \times 10^{-5}$ ).  $\Delta$ ligD+D tüve PaW85-ga võrreldes ilmnemise erinevused ainult IPTG juuresolekul 4. katsepäeval ( $4,3 \times 10^{-5}$ ). Tüvede ligDsm+D ja  $\Delta$ ligD+D vahelised erinevused võivad olla põhjustatud kas miniTn5 insertiooni mõjudest või katseandmete vähesusest. Saadud tulemuste kokkuvõtteks võib öelda, et LigD üleekspressioonil statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesagedus suureneb.



Joonis 10a. Phe<sup>+</sup> kolooniate akumulatsioon fenool-minimaaltassidel tüvedes ligDsm, ligDsm+D ja algses *P. putida* tüves. Igal järgneval päeval tekkinud kolooniate arv on liidetud eelneva katseperioodi jooksul tekkinud kolooniate arvule. 10. päeval näha olev kolooniate hulk on kogu katseperioodil tekkinud kolooniate summa. Phe<sup>+</sup> kolooniate teke on arvatud  $1 \times 10^9$  elusraku kohta. Joonisel on esitatud 3-7 sõltumatu katse keskmised ja 95% usalduspiirid.



Joonis 10b. Phe<sup>+</sup> kolooniate akumulatsioon fenool-minimaaltassidel tüvedes ΔligD, ΔligD+D ja algses *P. putida* tüves. Igal järgneval päeval tekkinud kolooniate arv on liidetud eelneva katseperioodi jooksul tekkinud kolooniate arvule. 10. päeval näha olev kolooniate hulk on kogu katseperioodil tekkinud kolooniate summa. Phe<sup>+</sup> kolooniate teke on arvatud  $1 \times 10^9$  elusraku kohta. Joonisel on esitatud 2-7 sõltumatu katse keskmised ja 95% usalduspiirid.

### 2.3.5 Phe<sup>+</sup> mutantide DNA järjestuse analüüs

Meie laboris on näidatud, et pKTpheA22TAG testsüsteemis tekivad deletsioonid *P. putida*'s RpoS puudumisel (Tarassova jt., 2009) ning ligDsm tüves neid ei teki (S. Sarv, bakalaureusetöö 2010). Selleks, et teada saada, kas deletsioone esineb ka LigD üleekspresseerimisel, sekveneerisime tüve ligDsm+D1 (mis olid selekteeritud IPTG suuresolekul söötmes) puhul isoleeritud Phe<sup>+</sup> mutantidest testplasmiidi pKTpheA22TAG *pheA* geenis oleva ala, mis sisaldas TAG stopp-koodonit. Sekveneerimiseks võtsime Phe<sup>+</sup> mutandid, mis tekkisid 3.-10. päeval. Kokku analüüsisime *pheA* geeni järjestust 58-l Phe<sup>+</sup> mutandil. Saadud mutatsioonispektrit võrdlesime laboris eelnevalt saadud tulemustega (Tegova jt., 2004; S. Sarv, bakalaureusetöö 2010; K. Mikkel, avaldamata andmed). Mutatsioonide tekkesagedused on toodud iga tüve kohta tabelis 4.

Tabel 4. Phe<sup>+</sup> mutantide mutatsioonispekter NHEJ ja RpoS defektsetes tüvedes. Tabelis on toodud Phe<sup>+</sup> mutatsioonide arv ja sulgudes iga mutatsiooni osakaal protsentides.

Nukleotiidi muutus	PaW85	ku	ligDsm	ligDsmku	rpoS	rpoSku	rpoSligDsm	ligDsm+D+IPTG
T → C	164 (77)	74 (45)	156 (72)	155 (76)	75 (4)	82 (59)	128 (70)	37 (64)
T → G	19 (9)	67 (41)	14 (6)	5 (2)	25 (13)	10 (7)	7 (4)	3 (5)
T → A	1 (0.5)	3 (2)	0 (0)	0 (0)	4 (2)	2 (1)	0 (0)	2 (3)
G → T	12 (6)	4 (2)	3 (1)	16 (8)	18 (10)	2 (1)	11 (6)	2 (3)
A → C	0 (0)	2 (1)	6 (3)	13 (6)	1 (1)	1 (1)	10 (5)	0 (0)
A → G	13 (6)	8 (5)	24 (11)	7 (3)	48 (26)	18 (13)	5 (3)	11 (19)
A → T	4 (2)	0 (0)	6 (3)	4 (2)	4 (2)	7 (5)	12 (7)	1 (2)
deletsioonid	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (0.5)	11 (6)	4 (3)	0 (0)	2 (3)
tundmatud	0 (0)	4 (2)	9 (4)	4 (2)	0 (0)	14 (10)	10 (5)	0 (0)
kokku	213	163	218	205	186	140	183	58

Selleks, et välja selgitada, kas tabelis 4 toodud tüvedes kirjeldatud mutatsioonispektrid erinevad üksteisest statistiliselt, kasutasime Monte Carlo meetodit (Adams ja Skopek, 1987; Piegorsch ja Bailer, 1994). Testi tulemused on toodud tabelis 5. Monte Carlo testi tulemused näitavad, et ligDsm ja ku tüvede puhul mutatsioonispektrid erinevad teineteisest ning erinevused ilmnevad ka võrdlusest algse tüvega PaW85. Ku deletandi puhul kirjeldatud mutatsioonispektri erinevus algse tüve omast võib olla põhjustatud sellest, et LigD peamise interaktsioonipartneri puudumine suurendab interaktsioonide tekkimise võimalusi teiste valkudega. Ei ole välistatud, et sel põhjusel osaleb LigD aktiivsemalt statsionaarse faasi

mutatsiooniprotsessides, põhjustades teatud tüüpi mutatsioonide teket. Lisaks nägime, et ka kõik need mutatsioonispektrid erinevad rpoS defektse tüve mutatsioonispektrist. Lisaks erinevad RpoS ja NHEJ valkude topeltdefektsetes tüvedes kirjeldatud mutatsioonispektrid ka algses tüves PaW85 kirjeldatust, mis viitab sellele, et teatud mutatsioonide tekkimine on seotud RpoS-i poolt reguleeritavate ensüümidega. LigD ja Ku topeltmutandi puhul nägime erinevusi võrreldes nii Ku kui ka LigD üksikmutantide puhul kirjeldatud mutatsioonispektritega. Oletame, et kui LigD ja Ku puuduvad samaaegselt, siis on võimalik aktiveerida alternatiivsed mehhanismid, mis osalevad statsionaarse faasi mutageneesil. Vähemalt ühe NHEJ valgu olemasolu võib seda takistada, mis omakorda avaldab mõju ka mutatsioonispektrile, nagu näeme tüvede ligDsm ja ligDsmku mutatsioonispektrite võrdlemisel. RpoSku tüve mutatsioonispekter on erinev kõigi tüvede mutatsioonispektritest peale LigD defektse tüve puhul kirjeldatud mutatsioonispektri. Siin võib tegemist olla alternatiivsete statsionaarse faasi mutageneesil osalevate mehhanismide mõjuga, mis ei sõltu RpoS-i olemasolust.

LigD üleekspressioonil saadud mutatsioonispekter erines Ku üksikmutandi ja ka Ku ja LigD topeltmutandi puhul kirjeldatud mutatsioonispektritest. Lisaks erines LigD üleekspressioonil saadud mutatsioonispekter ka algses tüves PaW85 kirjeldatud mutatsioonispektrist (kuigi *P* väärtus on piiri peal). RpoS ja LigD topelt-defektse tüve puhul nägime samuti mutatsioonispektri erinevust võrreldes LigD üleekspressioonil saadud mutatsioonispektriga. Samas ilmnes, et tüvede rpoS ja rpoSku puhul kirjeldatud mutatsioonispektrid on sarnased LigD üleekspressioonil saadud mutatsioonispektriga. See tulemus viitab sellele, et teatud mutatsioonide tekke osas mõjutab RpoS LigD-st sõltuvate mutatsioonide teket negatiivselt. Meile üllatuseks ilmnes, et LigD puudumisel ja üleekspressioonil on mutatsioonispektrid sarnased. Kuna me akumulatsioonikatsetes nägime nende tüvede puhul mutatsioonide tekkimise sageduste vahel erinevusi, siis ei saa see vastuolu olla tekkinud asjaolust, et LigD üleekspressiooni rakkudes ei toimu. Lisaks näeme, et nii LigD puudumisel kui ka üleekspressioonil saadud mutatsioonispektrid erinevad mõlemad algse tüve mutatsioonispektrist. Seega võiks siin põhjuseks olla LigD üleekspressioonitüve andmete vähesus ning antud juhul peaks selguse saamiseks lisakatseid tegema. Lisaks olid sarnased ka LigD Ku ning RpoS LigD topeltmutantide mutatsioonispektrid. Siin on ilmselt tegemist alternatiivse reparatsioonimehhanismiga, mis võiks olla samuti RpoS kontrolli all, kuna LigD defektse üksikmutandi ning RpoS ja LigD topeltdefektse mutandi puhul kirjeldatud mutatsioonispektrid erinevad teineteisest.

Tabel 5. Katses võrreldud NHEJ valkude ja RpoS defektsete tüvede ning algse *P. putida* tüve PaW85 ja saadud *P*-väärtused.

	PaW85	ku	ligDsm	ligDsmku	rpoS	rpoSku	rpoSligDsm
ku	$P < 0.0001$						
ligDsm	$P = 0.0001$ $P < 0.0001$						
ligDsmku	$P < 0.0001$ $P < 0.0001$ $P < 0.0001$						
rpoS	$P < 0.0001$ $P < 0.0001$ $P < 0.0001$ $P < 0.0001$						
rpoSku	$P < 0.0001$ $P < 0.0001$ $P = 0.008$ $P < 0.0001$ $P < 0.0001$						
rpoSligDsm	$P < 0.0001$ $P < 0.0001$ $P = 0.0006$ $P = 0.1283$ $P < 0.0001$ $P < 0.0001$						
ligDsm+D+IPTG	$P = 0.0018$ $P < 0.0001$ $P = 0.0049$ $P < 0.0001$ $P = 0.0914$ $P = 0.2225$ $P < 0.0001$						

Selleks, et teada saada, milliste mutatsioonide osas esinevad erinevused ning milliste mutatsioonide tekke eest võiks LigD vastutada, viisime läbi hii-ruut testi, kasutades programmi „Statgraphics“ (olulisusnivool 0,05). Järgnevalt kirjeldame lähemalt mõnda olulisematest seostest, mis selle testi abil ilmnesid. Kuigi deletsioone tekib võrreldes teiste mutatsioonidega väga vähe, ilmensid hii-ruut testi põhjal siiski teatud tüvede puhul erinevused. LigD puudumisel deletsioone üldiselt ei teki (Tabel 4). Erandiks on siin ligDsmku tüvi, kuid hii-ruut testi põhjal ei erine see tüvi PaW85-st konkreetse mutatsiooni tekke poolest. LigD üleekspressioonil ja RpoS puudumisel deletsioonide tekke osakaal suureneb. Hii-ruut testi tulemustele toetudes võib öelda, et LigD vastutab deletsioonide tekke eest statsionaarse faasi mutageneesil ning RpoS-i olemasolu pärsib seda.

LigD üleekspressioonil suurenes A  $\rightarrow$  G transitsiooni teke võrreldes algse tüvega (19 % kõikidest mutatsioonidest). RpoS ja rpoSku tüvede puhul moodustab A  $\rightarrow$  G mutatsioon vastavalt 26% ja 13% kõigist mutatsioonidest. Samas RpoS LigD ja Ku LigD topeltnutantide puhul on A  $\rightarrow$  G mutatsiooni tekkesagedus madalam isegi algse tüvega PaW85 võrreldes. Arvestades neid tulemusi võiks järeldada, et LigD osaleb A  $\rightarrow$  G transitsioonide tekkel. LigD üksikmutandi puhul teatava A  $\rightarrow$  G mutatsiooni tekkesageduse tõusu põhjuseks võrreldes algse tüvega võiks antud juhul olla RpoS sõltumatu mehhanism, mis käitub LigD-ga konkreetse mutatsiooni tekke puhul antagonistlikult.

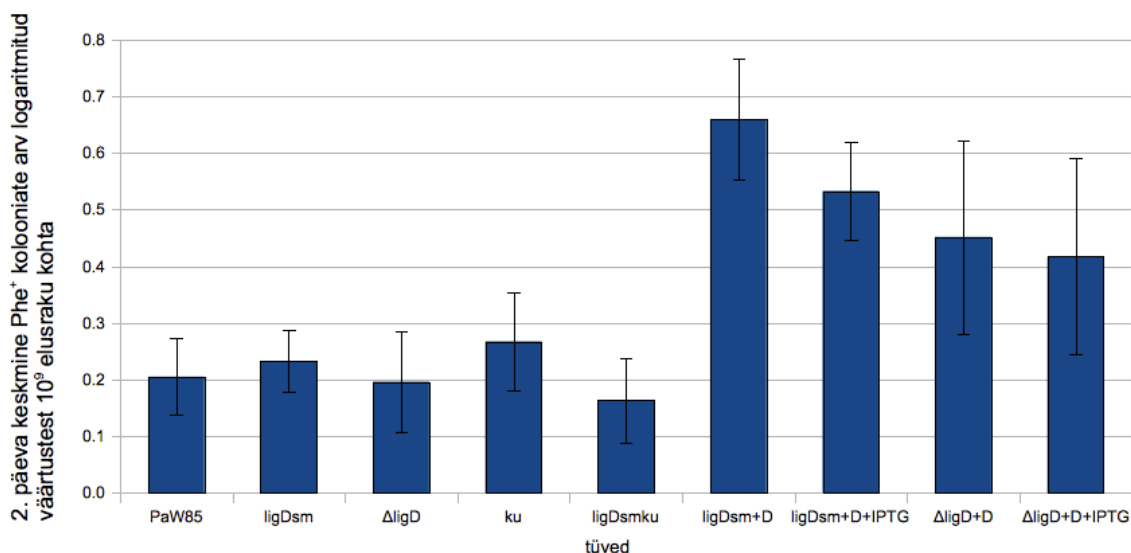
T  $\rightarrow$  G transversioonide tõusu (41% kõigist mutatsioonidest) poolest eristub Ku geeni deletant kõigist teistest tüvedest. Kuigi me rpoSku tüve puhul ega LigD üleekspressioonil T  $\rightarrow$  G mutatsiooni tekkesagedustes tõusu ei näe, ei saa me LigD osalust selle mutatsiooni tekkel siiski välistada konkreetse tüve (Ku defektse tüve) puhul. Oletame, et antud juhul võiks Ku puudumine võimaldada LigD-l vabamalt osaleda muudes protsessides peale NHEJ (sealhulgas mutageneesil). Lisaks võime hii-ruut testi põhjal oletada, et alternatiivne DNA polümeraas, mis statsionaarse faasi mutageneesil osaleb ja seeläbi takistab T  $\rightarrow$  G



transversioonide teket, võib olla RpoS-i poolt negatiivselt reguleeritud.

### 2.3.6 NHEJ valkude puudumise ja LigD üleekspressiooni mõju mutatsioonide tekkesagedusele kasvavates *P. putida* rakkudes

Selleks, et teada saada, kas kasvavaid rakke võiks mõjutada NHEJ valkude puudumine või LigD üleekspressioon, võrdlesime Phe<sup>+</sup> kolooniate akumulatsiooni katsetest 2. päevaks tekkinud mutantide arve. pKTpheA22TAG testsüsteemi puhul kulub Phe<sup>+</sup> koloonia ilmumiseks fenool-minimaaltassidel 2 päeva, seega on 2. päeval tassidele ilmunud kolooniates mutatsioonid tekkinud rakkudes, mis kasvasid vedelsöötmes enne selektiivsöötmele plaatimist (Tegova jt., 2004). Andmeanalüüsi teostasime „Tukey HSD“ testi abil.

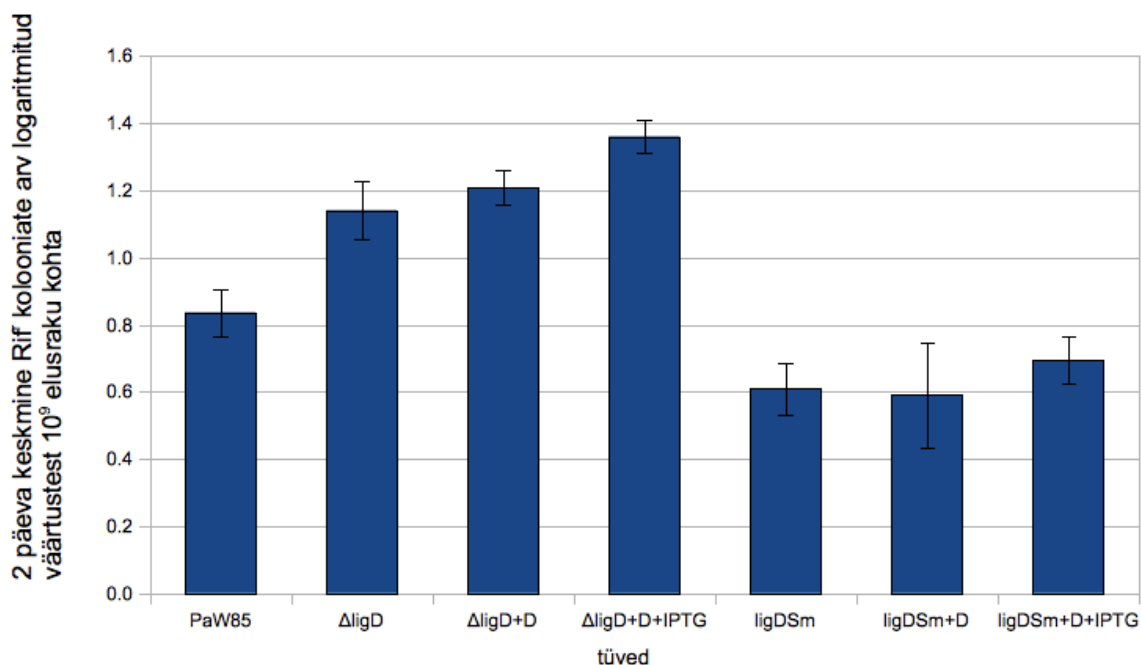


Joonis 11. Graafikul on esitatud fenool-minimaaltassidele tekkinud 2. päeval tekkinud Phe<sup>+</sup> kolooniate arvu logaritmitud väärtuste keskmine  $1 \times 10^9$  elusraku kohta. Igale tulbale on lisatud 95% usalduspiirid.

Võrrelduna PaW85-ga on „Tukey HSD“ testi põhjal ligDsm+D puhul  $P = 1,0 \times 10^{-5}$ , ligDsm+D+IPTG puhul  $P = 1,9 \times 10^{-5}$  ja ΔligD+D puhul  $P = 2,9 \times 10^{-2}$ . Omavahel *lacI-P<sub>lac</sub>ligD* geenikassetti sisaldavaid tüvesid võrreldes statistiliselt olulisi erinevusi ei ilmnenu. Huvitav on see, et erinevalt statsionaarse faasi mutatsioonidele kasvavates rakkudes IPTG lisamine söötmesse Phe<sup>+</sup> mutantide tekkesagedust *lacI-P<sub>lac</sub>ligD* geenikassetti sisaldavates tüvedes ei

suurendanud (võrdle jooniseid 10a ja 10b joonisega 11). Kuna  $P_{tac}$  promootor lekib sageli, siis võib  $P_{tac}$  promootorilt rakkudes ka IPTG olemasoluta toimuda *ligD* geeni transkriptsioon. Antud juhul ei pruugi IPTG lisamine efekti anda ka sel põhjusel, kuna LigD näol on tegemist vigu tekitava DNA polümeraasiga ning kasvavates rakkudes hoitakse selliste ensüümide kontsentratsioon võimalikult madalana.

Selleks, et uurida NHEJ valkude mõju mutatsioonisagedusele kasvavates rakkudes kromosoomis tekkivate mutatsioonide puhul, võrdlesime rifampitsiini reistentsete (Rif<sup>r</sup>) mutantide tekkesagedusi. Üllataval kombel on  $\Delta ligD$  tüvel Rif resistentsete mutantide tekkesagedus kõrgem kui algsel tüvel ( $P = 2,6 \times 10^{-5}$ ). Selle põhjal võiks arvata, et LigD olemasolu aitab ära hoida spontaansete mutatsioonide teket kromosoomis. *ligD* üleekspressioonikassett suurendab  $\Delta ligD$  tüves Rif resistentsete mutantide tekkesagedust üksnes IPTG lisamisel. Huvitav on see, et erinevalt  $\Delta ligD$  tüvest on *ligDsm* tüve puhul Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesagedus isegi madalam kui PaW85-l ( $P = 8,8 \times 10^{-4}$ ) ja jääb madalamaks ka *ligDsm*+D puhul ( $P = 1,4 \times 10^{-2}$ ). *lacI-P<sub>tac</sub>ligD* geenikasseti olemasolul *ligDsm* tüves ei ilmne mingit mõju mutatsioonide tekkesagedusele IPTG lisamisel. Nagu juba peatükis 2.3.1 mainitud, võivad erinevused  $\Delta ligD$  tüvest olla põhjustatud *ligDsm* tüve algsel selektsioonil toimunud muutustega.



Joonis 12. Graafikul on toodud 2 päeva jooksul tekkinud Rif resistentsete mutantide arvu logaritmitud väärtuste keskmine  $1 \times 10^9$  elusraku kohta. Igale tulbale on lisatud 95% usalduspiirid. Graafikul on esitatud 3-5 sõltumatu katse keskmised.

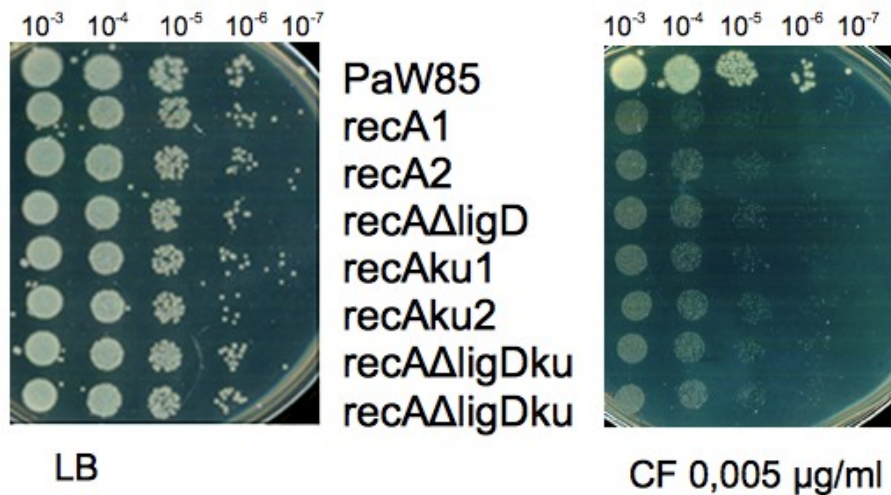
Erinevused kahe kasutatud testsüsteemi puhul saadud tulemustes võivad olla tingitud sellest, et esimeses leiab mutatsioonide teke aset plasmiidis ja teises kromosoomis. Seega võib NHEJ valkude puudumine või LigD üleekspressioon anda erinevaid tulemusi olenevalt mutatsioonide märklauaks oleva DNA asukohast.

### **2.3.7 NHEJ ja HR defektsete tüvede kemikaalide tundlikkuse määramine**

Määrasime NHEJ defektsete kasvavate rakkude tundlikkust ciprofloksatsiinile (CF), mitomütsiin C-le (MMC) ja nitrokinoliinile (NQO). Need kemikaalid indutseerivad rakkudes DSB-de teket ja seega võiks NHEJ osaleda selliste DNA kahjustuste parandamisel.

NHEJ defektsete tüvede kemikaalide tundlikkuse määramiseks konstrueerisime uued  $\Delta$ ligD ja  $\Delta$ ligDku tüved. Selgus, et laboris olemasolev ligDsm tüvi talub ciprofloksatsiini kontsentratsioone, millel isegi algse tüve PaW85 rakud surevad. Kuna kasvavates rakkudes parandatakse DSB-d homoloogilise rekombinatsiooni abil, mille üheks võtmevalguks on RecA, konstrueerisime lisaks NHEJ defektsetele tüvedele ka RecA defektsed tüved. Lisaks laboris olemasolevale recAku tüvele konstrueerisime recA $\Delta$ ligD ja recA $\Delta$ ligDku tüved. Tüvede konstrueerimine on kirjeldatud magistritöö osas “Materjal ja meetodika”, peatükis 2.2.2.

Kemikaale sisaldavatele tassidele pipeteerisime lahjendused 2 tundi kasvanud kultuurist ja üleöö kasvanud kultuurist. Selgus, et ühegi kemikaali mõju ei põhjusta märkimisväärsed erinevusi *P. putida* algse tüve ja NHEJ defektsete tüvede vahel. RecA defektsed tüved olid algse tüvega võrreldes kemikaalidele tundlikumad, kuid RecA ja NHEJ valkude topelt-defektsete tüvede puhul ei ilmnenud kemikaalide tundlikkusele lisaefekti (Joonis 13). Sellest võib järeldada, et kasvavates rakkudes ei vajata NHEJ rada DSB-de parandamiseks. Isegi HR ja NHEJ topelt-defektsed tüved jäävad DSB-de indutseerimisel ellu, kuigi nende kasv aeglustub.



Joonis 13. Joonisel on toodud näide RecA ja NHEJ defektsete tüvede kasvust LB (Luria-Bertani) söötmel ilma kemikaalide juuresolekuta ja LB söötmel, millele on lisatud ciprofloksatsiini (CF) lõppkontsentratsiooniga 0,005 µg/ml. Söötmel on pipeteeritud 5 µl üleöö kasvanud kultuuride igast lahjendusest ( $10^{-3}$  kuni  $10^{-7}$ ). RecA, RecA Ku ja RecA LigD Ku defektsuse korral on katsesse võetud kaks sõltumatult konstrueeritud tüve.

## 2.4 Arutelu

Ku ja LigD osalevad DSB-de parandamisel statsionaarses faasis, kui kromosoomist on rakus ainult üks koopia. Ku valk on homodimeer, mis seondub katke kohal DNA otstega ning kaitseb seda eksonukleasidest. LigD on multifunktsionaalne ensüüm, mis koosneb DNA polümeraasi, fosfoesteraasi ja ligaasi domeenidest. Seega on Ku ja LigD piisavad selleks, et viia bakterites läbi NHEJ-d. Biokeemiliste katsete abil on näidatud, et LigD PolDom-I on mitmeid erinevaid matriits-sõltuvaid ja -sõltumatuid aktiivsusi. Sealjuures puudub PolDom-I *proofreading*-aktiivsus, mistõttu on tegemist vigutegeva polümeraasiga. Mitmed töörühmad on näidanud, et nii plasmidi retsirkulariseerimine kui ka kromosomaalsete DSB-de parandamine NHEJ poolt on mutageenne (Aniukwu jt., 2007; Gong jt., 2005; Malyarchuk jt., 2007; Stephanou jt., 2007).

Lisaks mükobakteritele on biokeemilisi katseid tehtud ka *Pseudomonas aeruginosa* LigD ning Ku valkudega (Zhu ja Shuman, 2005; Yakovleva ja Shuman, 2006; Zhu ja Shuman, 2008; Zhu ja Shuman, 2010). Tulemused näitavad, et nende valkude töömehhanismid on mükobakterites ja *P. aeruginosa*'s sarnased (Zhu ja Shuman, 2010). Kuigi *Pseudomonas putida* ja *P. aeruginosa* LigD valgud erinevad omavahel domeenide asetuse poolest, kuuluvad need internetileheküljel <http://pseudomonas.com/> avaldatud andmete põhjal samasse ortoloogide gruppi. Seepärast tekkis ka meil huvi *P. putida* LigD polümeraasse aktiivsuse vastu. Meie laboris on eelnevalt näidatud, et vigutekitavad (*error-prone*, EP) DNA polümeraasid Pol IV (*dinB*) ja Pol V osalevad *P. putida* rakkudes statsionaarse faasi mutageneesil (Tark jt., 2005; Tegova jt., 2004). *dinB* geen on olemas *P. putida* kromosoomis, kuid Pol V on kodeeritud plasmiidilt pWW0. Pol IV vastutab raaminihke mutatsioonide tekkimise eest statsionaarses faasis olevates rakkudes, kuid selle polümeraasi geeni transkriptsioon ei ole kontrollitud statsionaarse sigma faktori RpoS poolt (Tegova jt., 2004) erinevalt *E. coli* Pol IV geenist (Layton ja Foster, 2003). 2009. a. näitasid Tarassova jt., et RpoS-i puudumisel tõuseb pKTpheA22TAG testsüsteemi puhul statsionaarses faasis olevates rakkudes mutatsioonide tekkesagedus järsult 5.-7. nälgimispäeval. Mutatsioonispektri analüüsil selgus, et lisaks asendusmutatsioonidele olid tekkinud ka deletsioonid, mida ei osatud tol korral seostada ühegi ensüümi osalusega. Toetudes kõigile neile teadmistele oletasime, et deletsioonide tekkega võiks olla seotud LigD valk just tänu oma EP DNAP-le aktiivsusele.

Seni on bakterites NHEJ valkude osalust uuritud peamiselt plasmidi lineariseerimisel.

Mõned töögrupid on näidanud, et Ku ja LigD olemasolu on vajalik kiirguse või kuivamise tõttu kromosoomis tekkinud DSB-de parandamisel pikka aega nälginud statsionaarse faasi rakkudes (Pitcher jt., 2007b; Stephanou jt., 2007). Meie tahtsime teada, kas LigD võiks NHEJ sõltumatult osaleda statsionaarse faasi mutageneesil. Selleks võrdlesime statsionaarse faasi mutatsioonide teket NHEJ valkude LigD ja Ku defektsetes *P. putida* tüvedes ja LigD üleekspressiooni tingimustes, kasutades kahte erinevat testsüsteemi. Esimene neist oli asendusmutatsioonide mõõtev plasmiidne testsüsteem (võimaldas tuvastada Phe<sup>+</sup> mutante) ning teine võimaldas mõõta spontaansete Rif<sup>r</sup> mutatsioonide teket vananenud kolooniates olevate bakterite kromosoomis. Plasmiidse testsüsteemi puhul statsionaarses faasis olevates rakkudes langeb mutatsioonide tekkesagedus LigD puudumisel (Joonis 7) ning tõuseb LigD üleekspressioonil (Joonis 10a, 10b). Mõningane trend mutatsioonisageduse vähenemisele võrreldes algse tüvega ilmneb ka Rif<sup>r</sup> mutatsioonide puhul (Joonis 8). Ku puudumine Phe<sup>+</sup> mutantide üleüldist tekkesagedust võrreldes algse tüvega ei mõjuta (kuigi mutatsioonispektrid on erinevad), kuid Ku ja LigD topelt-defektse tüve puhul tekib Phe<sup>+</sup> mutante võrreldavalt algse *P. putida* tüvega (Joonis 7). Stephanou jt., (2007) täheldasid samasugust efekti kasvavates *M. smegmatis*'e rakkudes kromosomaalse testsüsteemi puhul, mis võimaldas tekitada DSB-sid, mis olid substraadiks ainult NHEJ rajale (katke kohale homoloogilist DNA järjestust kromosoomis ei olnud). Toetudes eelnevalt eukarüootsete organismidega tehtud katsete tulemustele, pakkusid nad välja, et mõlema NHEJ valgu puudumisel on võimalik alternatiivsete reparatsioonimehhanismide aktivatsioon, mis on inhibeeritud vähemalt ühe NHEJ valgu olemasolul. Seega võib ka statsionaarse faasi mutageneesil *P. putida* rakkudes LigD ja Ku samaaegse puudumise kompenseerida alternatiivne reparatsioonimehhanism.

Jooniselt 9 näeme, et rpoS<sub>ligDsm</sub> tüve puhul esineb sarnaselt rpoS tüvega mutatsioonide tekkesageduse järsk tõus alates katse 5. - 7. katsepäevast. See näitab, et on ka LigD-st sõltumatuid mehhanisme, mis RpoS puudumisel mutatsioonide tekkesageduse tõusu põhjustavad. Samas vastutab LigD teatud tüüpi mutatsioonide tekke eest, nagu ilmnes mutatsioonispektrite analüüsil (Tabel 5). Sõltumatult konstrueeritud rpoS<sub>ku</sub> tüvede puhul nägime kahte tüüpi Phe<sup>+</sup> mutantide akumulatsiooni graafikuid. Osadel juhtudel suurenes bakterite pikaajalisel näljutamisel selektiivplaatidel mutatsioonisagedus sarnaselt RpoS defektsele tüvele, osadel juhtudel jäi aga Phe<sup>+</sup> mutantide tekkesagedus võrreldavaks algses tüves PaW85 mõõdetuga (Joonis 9). Eeldades, et Ku valk siiski ei osale statsionaarse faasi mutageneesil, peaksid katsed rpoS<sub>ku</sub> tüvega andma rpoS tüvega sarnased tulemused. Oletame, et rpoS<sub>ligD</sub> ja rpoS<sub>ku</sub> tüvedega tehtud katsetes, milles mutatsioonide tekkesagedus on võrreldav algse *P. putida* tüvega, võivad olla toimunud muutused, mis osaliselt

kompenseerivad RpoS puudumise.

Meie laboris on varem näidatud, et statsionaarse faasi sigma faktori RpoS puudumisel esinevad pKTpheA22TAG testsüsteemi puhul mutatsioonispektris deletsioonid (Tarassova jt., 2009) ning hiljem, et RpoS ja LigD samaaegsel puudumisel deletsioone ei teki (S. Sarv, bakalaureusetöö 2010). Need tulemused viitavad sellele, et LigD tänu oma DNA polümeraasele aktiivsusele võiks olla seotud deletsioonide tekkega statsionaarse faasi mutageneesil ning RpoS olemasolul on deletsioonide teke repressseeritud, mida kinnitavad ka käesoleva magistritöö raames tehtud katsete tulemused. RpoS puudumisel ja LigD üleekspressiooni korral deletsioonide tekkesagedustes erinevust ei ilmnenud. Lisaks nägime mutatsioonispektrite analüüsil, et LigD võib olla seotud ka  $A \rightarrow G$  mutatsiooni tekkega. Kuna statsionaarse faasi mutatsioonide tekke eest vastutavad ka teised mehhanismid peale LigD, ei saa välistada LigD osalust ka teiste mutatsioonide tekkel. Ku üksikmutandi puhul nägime uue „hotspot“ mutatsiooni  $T \rightarrow G$  teket, mille poolest ku tüvi eristus kõigist teistest tüvedest. Seega võiks  $T \rightarrow G$  mutatsiooni tekkesageduse tõusu Ku puudumisel mõjutada LigD. Oletame, et peamise interaktsioonipartneri puudumisel võib LigD suurema tõenäosusega seonduda teiste sobilike valkudega ning seeläbi osaleda ka muudes protsessides peale NHEJ. Siinkohal tuleb ära märkida, et veel ei teata täpselt, millised võiksid olla LigD interaktsioonipartnerid lisaks Ku-le.

Artikleid, milles on käsitletud NHEJ valkude puudumise mõju erinevate DSB-sid tekitavate tegurite juuresolekul kasvavatele rakkudele, ei ole just palju ning enamasti on neis mudelorganismidena kasutatud mükobaktereid. Neist uuringutest järeldub, et kuigi plasmidi retsirkulariseerimise eest vastutab ka kasvavates rakkudes enamasti NHEJ, parandatakse kromosoomis tekkinud DSB-sid muude mehhanismide abil, isegi kui homoloogilise DNA ahela leidmise eest vastutav RecA valk on puudu. See mehhanism leidis suuremas osas kinnitust ka *P. putida* puhul. Ilmnes, et plasmidse testsüsteemi puhul olid kasvavates rakkudes NHEJ defektsete tüvede ja PaW85 puhul mutatsioonide tekkesagedused omavahel võrreldavad ning LigD üleekspressioonikonstruktiga tüvedes oli mutatsioonide tekkesagedus veidi kõrgem (Joonis 11). IPTG juuresolekul mutatsioonide tekkesagedusele lisaefekti ei ilmnenud, mis võib olla põhjustatud asjaolust, et LigD näol on tegemist vigutegeva DNA polümeraasiga ning selle ekspressioon võib olla kasvavates rakkudes madalam. Meile üllatuseks ületas kromosomaalse testsüsteemi puhul kasvavates rakkudes Rif resistentsete mutantide tekkesagedus  $\Delta\text{ligD}$  tüve puhul mitmekordselt mutatsioonisagedust algses tüves (Joonis 12). Selle põhjal võiks järeldada, et LigD olemasolu vähendab kasvavates rakkudes Rif mutatsioonide tekkimist. Siin tekib aga vastuolu eeldusega, et vigu tegeva polümeraasina

on LigD ekspressioon rakkudes repressioneeritud. Üks võimalik seletus on, et Rif resistentsete mutatsioonide tekkesageduse tõus võib olla seotud regulatsioonimehhanismidega, milles LigD osaleb. Erinevalt  $\Delta\text{ligD}+\text{D}$  tüvest oli Rif<sup>r</sup> mutantide tekkesagedus  $\text{ligDsm}+\text{D}$  tüve puhul sarnane algses *P. putida* tüves mõõdetule ning IPTG lisamine seda ei suurendanud.

Oletasime, et *sm<sup>r</sup>* geen, millega *ligD* geen on katkestatud, võib mõjutada rakkude füsioloogiat, kuid jäi ka võimalus, et juba tüve selekteerimisel streptomütsiini sisaldaval selektiivsöötmel isoleerisime mutandi, mis talus streptomütsiini paremini. Selgus, et *ligDsm* tüvi talus võrreldes teiste tüvedega oluliselt paremini ka ciprofloksatsiini. Nii ilmnis kemikaalide tundlikkuse testimisel, et *ligDsm* tüvi on resistentne ciprofloksatsiinile kuni kümme korda suuremas kontsentratsioonis kui algne tüvi PaW85 (andmeid ei ole esitatud). Lisaks nägime selle tüve puhul vähenenud tundlikkust ka nitrokinoliinile. See ajendaski meid konstrueerima  $\Delta\text{ligD}$  ja  $\Delta\text{ligDku}$  tüvesid, et selgitada välja, kas kemikaalidele tundlikkuse vähenemise efektid *ligDsm* tüves on põhjustatud LigD puudumisest või lisamutatsioonist selles tüves.  $\Delta\text{ligD}$  tüve kemikaalide tundlikkus oli võrreldav algse tüve PaW85 ning ku ja  $\Delta\text{ligDku}$  tüvede kemikaalide tundlikkusega. Nende katsetulemuste põhjal välistasime võimaluse, et LigD puudumine võiks suurendada *P. putida* rakkude ellujäämist ciprofloksatsiini juuresolekul. Selleks, et selgitada, kas ciprofloksatsiini taluvus on seotud *sm<sup>r</sup>* geeniga või mitte, testisime ka erinevate laboris olemasolevate *sm<sup>r</sup>* geeni sisaldavate tüvede tundlikkust ciprofloksatsiinile (andmeid ei ole esitatud). Selgus, et ciprofloksatsiini resistentsus ei ole seotud *sm<sup>r</sup>* geeni olemasoluga. Seega olid resistentsusefektid tüves *ligDsm* ilmselt põhjustatud rakkude seleksioonist streptomütsiini sisaldaval söötmel, mistõttu ei ole *ligDsm* tüvi sobilik kemikaalide tundlikkuse testimiseks. Oleme näinud, et bakterite selekteerimisel streptomütsiini sisaldaval söötmel tekib kergesti spontaanseid Sm resistentseid mutante, kus mutatsiooni tagajärjel on suurenenud mõne rakust kahjulikke aineid väljutava pumba (*efflux pump*) ekspressioon. Oletame, et ka *ligDsm* tüve puhul on tekkinud mutatsioon, mis võimendab mõne pumba tööd.

NHEJ ja HR defektsete tüvede tundlikkust kemikaalidele testisime kolme DSB-sid tekitava kemikaali puhul. Ciprofloksatsiin on kinoloon, mis inhibeerib DNA güraasi, mille tagajärjel tekivad DNA-s kaksikahelalised katked. Mitomütsiin C tekitab DNA ahelates ristsidemeid, mis võivad samuti viia DSB-de tekkeni (Korychka-Machala jt., 2006). Nitrokinoliin on tugev oksüdeerija, põhjustades ROS-i teket rakkudes, mis võivad samuti viia DSB-de tekkeni. Tänu oma toimemehhanismidele mõjutavad need kemikaalid kasvavaid rakke. Stephanou jt., 2007 näitasid, et ka *M. smegmatis*'es ei mõjuta ciprofloksatsiin NHEJ valkude puudumisel rakkude kasvu, kuid RecA puudulikud rakud olid sellele antibiootikumile



ülitundlikud võrreldes algse tüvega. Korychka-Machala jt., 2006 näitasid, et *M. smegmatis*'e kasvavad rakud ei ole MMC-le tundlikud ja MMC põhjustatud DNA kahjustuste parandamisel on oluline roll RecA valgul. Mõlemal juhul olid katsed ajendatud asjaolust, et eukarüootsetes organismides osalevad NHEJ valgud ciprofloksatsiini ja MMC poolt põhjustatud DNA kahjustuste parandamisel. *P. putida* puhul nägime samuti, et RecA puudumisel muutusid rakud ülitundlikuks eelpool mainitud kemikaalidele, kuid NHEJ valkude puudumine lisaks RecA-le ciprofloksatsiini tundlikkust ei suurenenud. Seega ei vaja *P. putida* kasvavates rakkudes NHEJ-d DSB-de parandamisel.

## Kokkuvõte

Bakterirakkudes on genoomi stabiilsuse eest vastutavate protsesside toimumine reguleeritud keskkonnatingimuste poolt. Kasvavates rakkudes hoitakse mutatsioonide tekkesagedus võimalikult madalana, kuid ebasoodsate kasvutingimuste puhul võib mutatsioonisagedus suurenda. Mutatsioonide tekkesageduse suurenemine on tingitud teatud DNA reparatsioonimehhanismide represseerimisest ja vigu tegevate DNA polümeraaside osalemisest DNA sünteesil.

Prokarüootides parandatakse DSB-sid statsionaarses faasis DNA otste mittehomoloogilise ühendamise (NHEJ) abil, mida viivad läbi Ku ja LigD valgud. NHEJ toimumine ei vaja homoloogilist DNA matriits-ahelat ja on mutageenne. Üheks mutatsioonide tekkepõhjuseks on LigD vigu tegev DNA polümeraasne aktiivsus. Seda, kas LigD võiks osaleda ka statsionaarse faasi mutageneesil, ei ole seni uuritud.

Käesoleva töö kirjanduse ülevaates kirjeldasin bakterites olulisemaid DNA reparatsioonimehhanisme, käsitledes põhjalikumalt NHEJ mehhanisme.

Minu töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli uurida NHEJ valkude Ku ja LigD mõju mutageneesile *Pseudomonas putida* kasvavates rakkudes ja statsionaarses faasis olevates rakkudes.

Töö tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. LigD puudumisel statsionaarses faasis olevates rakkudes mutatsioonide tekkesagedus väheneb ning LigD üleekspressioonil mutatsioonide tekkesagedus suureneb võrreldes algse *P. putida* tüvega, kinnitades meie hüpoteesi, et LigD osaleb statsionaarse faasi mutageneesil.
2. LigD osalus statsionaarse faasi mutageneesil on NHEJ-st sõltumatu ja ei vaja Ku valku.
3. Nii LigD puudumine kui ka ekspressioonitaseme suurendamine mõjutavad deletsioonide ja mitmete asendusmutatsioonide ( $A \rightarrow G$  ja  $T \rightarrow G$ ) teket *P. putida* statsionaarse faasi rakkudes, kusjuures deletsioonide teket pärssib statsionaarse faasi sigma faktor RpoS.
4. LigD osalus mutatsiooniprotsessides on erinev, sõltudes sellest, kas mutatsioonid tekivad plasmiidis või kromosoomis.

## Participation of NHEJ enzymes in mutational processes in the bacterium

### *Pseudomonas putida*

#### Summary

In bacterial cells, environmental conditions regulate mechanisms that are responsible for genomic stability. In growing cells, mutation frequencies are held as low as possible, but mutation frequency can be increased under stressful conditions which restrict bacterial growth. The frequency of mutations in stationary-phase bacteria can be elevated due to down-regulation of distinct DNA repair pathways and participation of error-prone DNA polymerases in DNA synthesis.

In prokaryotes, non-homologous DNA end-joining (NHEJ) pathway, which requires DNA ends-trimming enzyme Ku and multifunctional DNA ligase LigD, is involved in DSB repair during stationary phase. Since NHEJ does not rely on a homologous DNA template, this repair pathway can be mutagenic due to LigD error-prone polymerase domain. So far the role of LigD in stationary-phase mutagenesis has not been addressed.

The literature review of my study describes the DNA repair pathways in bacteria. Especial attention has been drawn to the mechanisms of NHEJ in bacteria.

The aim of the experimental part of my work was to investigate the role of NHEJ enzymes Ku and LigD in mutational processes in growing and stationary-phase cells in the bacterium *Pseudomonas putida*.

The results can be summarized as following:

1. The frequency of accumulation of stationary-phase mutations under long-term starvation of *P. putida* was reduced in LigD deficient cells and elevated during overexpression of LigD. These results support our hypothesis that LigD participates in stationary-phase mutagenesis.
2. LigD participates in stationary-phase mutagenesis in a pathway which is separate from NHEJ and does not require Ku.
3. Both the absence of LigD and overexpression of this enzyme influenced the frequency of occurrence of deletions and some base substitutions (A → G ja T → G), whereas the occurrence of deletions was negatively affected by the stationary-phase sigma factor RpoS.
4. Deficiency of LigD and its overexpression in growing cells of *P. putida* affects mutagenic processes in plasmid and in chromosome differently.

## Kasutatud kirjandus

- Abella, M., Erill, I., Jara, M., Mazon, G., Campoy, S. & Barbe, J. (2004). Widespread distribution of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the Proteobacteria phylum. *Mol Microbiol* **54**, 212–222.
- Adams, M. H. (1959). Bacteriophages. Interscience Publishers Inc. N. Y. 445-447.
- Adams, W. T. & Skopek, T. R. (1987). Statistical test for the comparison of samples from mutational spectra. *J Mol Biol* **194**, 391–396.
- Almeida, K. H. & Sobol, R. W. (2007). A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)* **6**, 695–711.
- Aniukwu, J., Glickman, M. S. & Shuman, S. (2008). The pathways and outcomes of mycobacterial NHEJ depend on the structure of the broken DNA ends. *Genes Dev* **22**, 512–527.
- Aravind, L. & Koonin, E. V. (2001). Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Res* **11**, 1365–1374.
- Ayora, S., Carrasco, B., Cardenas, P. P., Cesar, C. E., Canas, C., Yadav, T., Marchisone, C. & Alonso, J. C. (2011). Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 1055–1081.
- Bartlett, E. J., Brissett, N. C. & Doherty, A. J. (2013). Ribonucleolytic resection is required for repair of strand displaced nonhomologous end-joining intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Battesti, A., Majdalani, N. & Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **65**, 189–213.
- Bauchop, T. & Elsdén, S. R. (1960). The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *J Gen Microbiol* **23**, 457–469.
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G. & Broda, P. (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *MGG* **154**, 203–204.
- Bjedov, I., Tenaillon, O., Gerard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F. &

- Matic, I. (2003).** Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* **300**, 1404–1409.
- Boshoff, H. I., Reed, M. B., Barry, C. E. r. & Mizrahi, V. (2003).** DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* **113**, 183–193.
- Bowater, R. & Doherty, A. J. (2006).** Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet* **2**, e8.
- Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D. (1969).** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**, 459–472.
- Brégeon, D., Matic, I., Radman, M. & Taddei, F. (1999).** Inefficient mismatch repair: genetic defects and down regulation. *Genetics* **78**, 21–28.
- Brissett, N. C. & Doherty, A. J. (2009).** Repairing DNA double-strand breaks by the prokaryotic non-homologous end-joining pathway. *Biochem Soc Trans* **37**, 539–545.
- Brissett, N. C., Pitcher, R. S., Juarez, R., Picher, A. J., Green, A. J., Dafforn, T. R., Fox, G. C., Blanco, L. & Doherty, A. J. (2007).** Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science* **318**, 456–459.
- Cariello, N. F., Piegorsch, W. W., Adams, W. T. & Skopek, T. R. (1994).** Computer program for the analysis of mutational spectra: application to p53 mutations. *Carcinogenesis* **15**, 2281–2285.
- Chayot, R., Montagne, B., Mazel, D. & Ricchetti, M. (2010).** An end-joining repair mechanism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2141–2146.
- Choi, K.-H., Kumar, A. & Schweizer, H. P. (2006).** A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* **64**, 391–397.
- David, S. S., O’Shea, V. L. & Kundu, S. (2007).** Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* **447**, 941–950.
- Della, M., Palmbo, P. L., Tseng, H.-M., Tonkin, L. M., Daley, J. M., Topper, L. M., Pitcher, R. S., Tomkinson, A. E., Wilson, T. E. & Doherty, A. J. (2004).** Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science* **306**, 683–685.
- Dillingham, M. S. & Kowalczykowski, S. C. (2008).** RecBCD enzyme and the repair of

double-stranded DNA breaks. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 642–671.

**Doherty, A. J., Jackson, S. P. & Weller, G. R. (2001).** Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins. *FEBS letters* **500**, 186.

**Figurski, D. H. & Helinski, D. R. (1979).** Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *PNAS* **76**, 1648–1652.

**Galhardo, R. S., Rocha, R. P., Marques, M. V. & Menck, C. F. (2005).** An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* **33**, 2603–2614.

**Foster, P. L. (2007).** Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**, 373–397.

**Gong, C., Bongiorno, P., Martins, A., Stephanou, N. C., Zhu, H., Shuman, S. & Glickman, M. S. (2005).** Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 304–312.

**Gong, C., Martins, A., Bongiorno, P., Glickman, M. & Shuman, S. (2004).** Biochemical and genetic analysis of the four DNA ligases of mycobacteria. *J Biol Chem* **279**, 20594–20606.

**Goodman, M. F. (2002).** Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **71**, 17–50.

**Gros, L., Sapparbaev, M. K. & Laval, J. (2002).** Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* **21**, 8905–8925.

**Gu, J. & Lieber, M. R. (2008).** Mechanistic flexibility as a conserved theme across 3 billion years of nonhomologous DNA end-joining. *Genes Dev* **22**, 411–415.

**Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1990).** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Bacteriol* **172**, 6557–6567.

**Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989).** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61–68.

**Jatsenko, T., Tover, A., Tegova, R. & Kivisaar, M. (2010).** Molecular characterization of Rif<sup>r</sup> mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mutat Res* **683**, 106–

- Kha, D. T., Wang, G., Natrajan, N., Harrison, L. & Vasquez, K. M. (2010).** Pathways for Double-strand Break Repair in Genetically Unstable Z-DNA-forming Sequences. *J Mol Biol* **398**, 471–480.
- Kobayashi, H., Simmons, L. A., Yuan, D. S., Broughton, W. J. & Walker, G. C. (2008).** Multiple Ku orthologues mediate DNA non-homologous end-joining in the free-living form and during chronic infection of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* **67**, 350–363.
- Koorits, L., Tegova, R., Tark, M., Tarassova, K., Tover, A. & Kivisaar, M. (2007).** Study of involvement of ImuB and DnaE2 in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *DNA Repair (Amst)* **6**, 863–868.
- Kunkel, T. A. & Erie, D. A. (2005).** DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* **74**, 681–710.
- Layton, J. C. & Foster, P. L. (2003).** Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **50**, 549–561.
- Lea, D. E. & Coulson, C. A. (1949).** The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *Genetics* **49**, 264–285.
- Lieber, M. R. (2010).** The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* **79**, 181–211.
- Malyarchuk, S., Wright, D., Castore, R., Klepper, E., Weiss, B., Doherty, A. J. & Harrison, L. (2007).** Expression of *Mycobacterium tuberculosis* Ku and Ligase D in *Escherichia coli* results in RecA and RecB-independent DNA end-joining at regions of microhomology. *DNA Repair (Amst)* **6**, 1413–1424.
- Marti, T. M., Kunz, C. & Fleck, O. (2002).** DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physio* **191**, 28–41.
- Martinez-Garcia, E., Calles, B., Arevalo-Rodriguez, M. & de Lorenzo, V. (2011).** pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiol* **11**, 38.
- Martínez-García, E. & de Lorenzo, V. (2011).** Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Env Microbiol* **13**, 2702–2716.
- Mattimore, V. & Battista, J. R. (1996).** Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*:

functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J Bacteriol* **178**, 633–637.

**Michaels, M. L., Cruz, C., Grollman, A. P. & Miller, J. H. (1992).** Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7022–7025.

**Miller, J. H. (1972).** *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New York.

**Moeller, R., Stackebrandt, E., Reitz, G., Berger, T., Rettberg, P., Doherty, A. J., Horneck, G. & Nicholson, W. L. (2007).** Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono-and polychromatic UV, and ionizing radiation. *J Bacteriol* **189**, 3306–3311.

**Nair, P. A., Smith, P. & Shuman, S. (2010).** Structure of bacterial LigD 3'-phosphoesterase unveils a DNA repair superfamily. *PNAS* **107**, 12822–12827.

**Nakahara, T., Zhang, Q. M., Hashiguchi, K. & Yonei, S. (2000).** Identification of proteins of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* that specifically bind to C/C mismatches in DNA. *Nucleic Acids Res* **28**, 2551–2556.

**Natarajan, A., Dutta, K., Temel, D. B., Nair, P. A., Shuman, S. & Ghose, R. (2012).** Solution structure and DNA-binding properties of the phosphoesterase domain of DNA ligase D. *Nucleic Acids Res* **40**, 2076–2088.

**Nohmi, T. (2006).** Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases. *Annu Rev Microbiol* **60**, 231–253.

**Ojangu, E. L., Tover, A., Teras, R. & Kivisaar, M. (2000).** Effects of combination of different -10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor  $\sigma^S$ -dependent transcription in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **182**, 6707–6713.

**Pavel, H., Forsman, M. & Shingler, V. (1994).** An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600 on para-substituted methylphenols. *J Bacteriol* **176**, 7550–7557.

**Penfold, R. J. & Pemberton, J. M. (1992).** An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. *Gene* **118**, 145–146.

**Piegorsch, W. W. & Bailer, A. J. (1994).** Statistical approaches for analyzing mutational spectra: some recommendations for categorical data. *Genetics* **136**, 403–416.



- Pitcher, R. S., Brissett, N. C. & Doherty, A. J. (2007a).** Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective. *Annu Rev Microbiol* **61**, 259–282.
- Pitcher, R. S., Green, A. J., Brzostek, A., Korycka-Machala, M., Dziadek, J. & Doherty, A. J. (2007b).** NHEJ protects mycobacteria in stationary phase against the harmful effects of desiccation. *DNA Repair (Amst)* **6**, 1271–1276.
- Pitcher, R. S., Tonkin, L. M., Daley, J. M., Palmboos, P. L., Green, A. J., Velting, T. L., Brzostek, A., Korycka-Machala, M., Cresawn, S. & Dziadek, J. (2006).** Mycobacteriophage exploit NHEJ to facilitate genome circularization. *Mol Cell* **23**, 743–748.
- Pitcher, R. S., Tonkin, L. M., Green, A. J. & Doherty, A. J. (2005).** Domain Structure of a NHEJ DNA Repair Ligase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol* **351**, 531–544.
- Rosenberg, S. M. & Hastings, P. J. (2004).** Adaptive point mutation and adaptive amplification pathways in the *Escherichia coli* Lac system: stress responses producing genetic change. *J Bacteriol* **186**, 4838–4843.
- Saint-Ruf, C. & Matic, I. (2006).** Environmental tuning of mutation rates. *Env Microbiol* **8**, 193–199.
- Shapiro, S. S. & Wilk, M. B. (1965).** An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **52**, 591–611.
- Sharma, R. C. & Schimke, R. T. (1996).** Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* **20**, 42–44.
- Shuman, S. & Glickman, M. S. (2007).** Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol* **5**, 852–861.
- Stephanou, N. C., Gao, F., Bongiorno, P., Ehrt, S., Schnappinger, D., Shuman, S. & Glickman, M. S. (2007).** Mycobacterial nonhomologous end joining mediates mutagenic repair of chromosomal double-strand DNA breaks. *J Bacteriol* **189**, 5237–5246.
- Tarassova, K., Tegova, R., Tover, A., Teras, R., Tark, M., Saumaa, S. & Kivisaar, M. (2009).** Elevated mutation frequency in surviving populations of carbon-starved rpoS-deficient *Pseudomonas putida* is caused by reduced expression of superoxide dismutase and catalase. *J Bacteriol* **191**, 3604–3614.
- Tark, M., Tover, A., Tarassova, K., Tegova, R., Kivi, G., Horak, R. & Kivisaar, M. (2005).** A DNA polymerase V homologue encoded by TOL plasmid pWW0 confers evolutionary fitness on *Pseudomonas putida* under conditions of environmental stress. *J Bacteriol* **187**,

5203–5213.

**Tegova, R., Tover, A., Tarassova, K., Tark, M. & Kivisaar, M. (2004).** Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **186**, 2735–2744.

**Theis, K., Skorvaga, M., Machius, M., Nakagawa, N., Van Houten, B. & Kisker, C. (2000).** The nucleotide excision repair protein UvrB, a helicase-like enzyme with a catch. *Mutation Research/DNA Repair* **460**, 277–300.

**Tomkinson, A. E., Vijayakumar, S., Pascal, J. M. & Ellenberger, T. (2006).** DNA ligases: structure, reaction mechanism, and function. *Chem Rev* **106**, 687–699.

**Truglio, J. J., Croteau, D. L., Van Houten, B. & Kisker, C. (2006).** Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chem Rev* **106**, 233–252.

**Wang, S. T., Setlow, B., Conlon, E. M., Lyon, J. L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R. & Eichenberger, P. (2006).** The Forespore Line of Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **358**, 16–37.

**Weller, G. R., Kysela, B., Roy, R., Tonkin, L. M., Scanlan, E., Della, M., Devine, S. K., Day, J. P., Wilkinson, A. & di Fagagna, F. d. A. (2002).** Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science* **297**, 1686–1689.

**Wigley, D. B. (2012).** Bacterial DNA repair: recent insights into the mechanism of RecBCD, AddAB and AdnAB. *Nat Rev Microbiol* **11**, 9–13.

**Wilson, T. E., Topper, L. M. & Palmbos, P. L. (2003).** Non-homologous end-joining: bacteria join the chromosome breakdance. *TIBS* **28**, 62–66.

**Wong, S. M. & Mekalanos, J. J. (2000).** Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* **97**, 10191–10196.

**Yakovleva, L. & Shuman, S. (2006).** Nucleotide misincorporation, 3'-mismatch extension, and responses to abasic sites and DNA adducts by the polymerase component of bacterial DNA ligase D. *J Biol Chem* **281**, 25026–25040.

**Yeiser, B., Pepper, E. D., Goodman, M. F. & Finkel, S. E. (2002).** SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *PNAS* **99**, 8737–8741.

**Zhu, H. & Shuman, S. (2005).** A primer-dependent polymerase function of *Pseudomonas aeruginosa* ATP-dependent DNA ligase (LigD). *J Biol Chem* **280**, 418–427.

**Zhu, H. & Shuman, S. (2008).** Bacterial nonhomologous end joining ligases preferentially seal breaks with a 3'-OH monoribonucleotide. *J Biol Chem* **283**, 8331–8339.

**Zhu, H. & Shuman, S. (2010).** Gap filling activities of *Pseudomonas* DNA ligase D (LigD) polymerase and functional interactions of LigD with the DNA end-binding Ku protein. *J Biol Chem* **285**, 4815–4825.

## Kasutatud veebiaadressid

<http://pseudomonas.com/>

<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Ülvi Kana (01.10.1984)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „NHEJ ensüümide osalus mutatsiooniprotsessides bakteris *Pseudomonas putida*“, mille juhendaja on Maia Kivisaar,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013